

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PARMA
FACOLTA' DI MEDICINA VETERINARIA
DIPARTIMENTO DI SALUTE ANIMALE
SEZIONE DI ENDOCRINOLOGIA E FARMACOLOGIA
VETERINARIA

TESI DI DOTTORATO DI RICERCA
IN SALUTE ANIMALE
XXI CICLO

CONTROLLO NEUROENDOCRINO DELL'ATTIVITÀ OVARICA NELLA
CAGNA E NELLA GATTA

Coordinatore:

Chiar.mo Prof. SANDRO CAVIRANI

Tutore:

Chiar.mo Prof. FABIO DE RENSIS

Dottorando di Ricerca:

Dott.ssa VALENTINA BORGHI

ANNI ACCADEMICI 2006-2008

Ai miei cari

INDICE

Riassunto ed Abstract	pag. 5
A. Introduzione	
1. Il controllo endocrino dell'attività riproduttiva nella cagna	pag. 7
1.a Ciclo estrale nella cagna	pag. 7
1.b La regolazione endocrina del ciclo estrale	pag. 9
1.c Ecografia ovarica nella cagna	pag. 10
2. Il controllo endocrino dell'attività riproduttiva nella gatta	pag. 12
2.a Ciclo estrale nella gatta	pag. 12
2.b La regolazione endocrina del ciclo estrale	pag. 14
2.c Ecografia ovarica nella gatta	pag. 16
3. Induzione dell'estro nella cagna e nella gatta	pag. 19
3.a Induzione dell'estro nella cagna	pag. 19
I. Introduzione	pag. 19
II. Agonisti della dopamina	pag. 19
III. Gonadotropine	pag. 22
IV. GnRH e suoi analoghi	pag. 24
V. Conclusioni	pag. 26
3.b Induzione dell'estro nella gatta	pag. 27
I. Introduzione	pag. 27
II. Gonadotropine	pag. 27
III. GnRH e suoi analoghi	pag. 29
IV. Agonisti della dopamina	pag. 29
V. Antagonisti degli oppioidi	pag. 30
VI. Conclusioni	pag. 30
4. Il sistema dopaminergico, la prolattina ed il controllo dell'attività ovarica	pag. 32
4.a Introduzione	pag. 32
4.b Sintesi della prolattina	pag. 32
4.c Regolazione della secrezione della prolattina	pag. 34
I. Introduzione	pag. 34
II. Regolazione da parte del sistema nervoso centrale	pag. 34
III. Regolazione ipofisaria paracrina ed autocrina	pag. 48

IV.	Regolazione legata ad organi periferici	pag. 49
V.	Conclusioni	pag. 52
4.d	Variazioni nella secrezione della prolattina	pag. 52
4.e	Azioni biologiche della prolattina	pag. 58
B. Parte sperimentale		
5.	Effetto della somministrazione di un agonista della dopamina sul profilo endocrino in cagne in anestro, proestro ed estro	pag. 61
5.a	Introduzione	pag. 61
5.b	Esperimento 1: effetto della somministrazione di cabergolina sulla ripresa dell'attività riproduttiva della cagna in anestro	pag. 63
I.	Materiali e metodi	pag. 63
II.	Risultati	pag. 65
III.	Discussione	pag. 68
5.c	Esperimento 2: risposta di LH, progesterone e prolattina alla somministrazione di cabergolina in cagne trattate in proestro ed estro	pag. 70
I.	Materiali e metodi	pag. 70
II.	Risultati	pag. 71
III.	Discussione	pag. 72
6.	Esperimento 3: studio clinico delle cisti ovariche nella gatta	pag. 75
6.a	Introduzione	pag. 75
6.b	Segnalamento ed analisi ormonali	pag. 76
6.c	Motivo della visita e piano diagnostico	pag. 77
6.d	Discussione	pag. 78
Conclusioni		pag. 83
Bibliografia		pag. 85

RIASSUNTO

Il presente lavoro si prefissa di ampliare le conoscenze riguardanti il controllo neuroendocrino della riproduzione nel cane e nel gatto. In particolare approfondisce il ruolo della prolattina e del sistema dopaminergico nell'influenzare il ciclo estrale della specie canina.

In questa tesi è stato indagato soprattutto il ruolo della dopamina, della prolattina, dell'LH e del progesterone nel controllo dell'attività ovarica della cagna in anestro, proestro ed estro.

Il primo esperimento è consistito nella somministrazione di un agonista della dopamina, la Cabergolina, alla dose di 5 µg/Kg/die in cagne in fase anestrale per 4 settimane o fino alla comparsa del proestro. Le concentrazioni plasmatiche di LH sono aumentate prima del proestro ad indicare una stimolazione da parte del sistema dopaminergico o forse una soppressione di fattori inibenti l'LH. Le concentrazioni plasmatiche di prolattina, invece, non si sono modificate indicando che la prolattina non è coinvolta nella follicologenesi.

Il secondo esperimento ha indagato le eventuali influenze degli agonisti della prolattina sullo sviluppo follicolare e luteinico mediante la somministrazione di Cabergolina alla dose di 5µg/Kg/die in cagne al primo giorno di proestro per 20 giorni. Sono stati, poi, analizzati i livelli ormonali di LH, prolattina e progesterone: questi mostravano profili sovrapponibili al gruppo di controllo a suggerire che la Cabergolina somministrata durante il proestro e l'estro non alteri lo sviluppo follicolare o luteinico.

L'esperimento condotto nella gatta consiste in uno studio preliminare sulle cisti ovariche e la valutazione della loro funzionalità.

ABSTRACT

The object of this research is to investigate the role of dopaminergic system in controlling the reproduction in domestic bitch and to observe the ovarian cysts in queen.

The first experiment consisted in the administration of cabergoline, a dopamine agonist, during the anestrus for 4 weeks or till the proestrus in order to reduce the inter-estrus interval. The results suggested that the prolactin doesn't have a preminent role in the termination of anestrus, instead, the dopaminergic system seems to be important in stimulating hypothalamo-pituitary-ovary in order to induce follicular development.

The second experiment consisted of administration of cabergoline for 20 days beginning on the first day of proestrus. The plasma was assayed for LH, prolactin and progesterone in order to investigate the role of dopamine agonist in modify the pro-estrus and estrus. The results suggested that the cabergolina does not modify the duration of these phases and doesn't affect the follicular or luteal function.

The last study was carried out on a queen with an ovarian cyst. The ultrasound examination showed that ovarian cyst in queen could spontaneously regress.

CAP.1 IL CONTROLLO ENDOCRINO DELL'ATTIVITÀ RIPRODUTTIVA NELLA CAGNA

1.a Ciclo estrale nella cagna

La cagna è un animale monoestrale stagionale in quanto presenta un solo estro durante ogni periodo riproduttivo (2 cicli all'anno). Il ciclo estrale può coincidere con qualsiasi mese dell'anno (Bouchard et al., 1991) anche se l'incidenza degli estri è maggiore nei mesi invernali e primaverili. Ricordiamo, inoltre, che la lunghezza dell'intervallo interestrale è influenzata dalla razza: per esempio nei pastori tedeschi l'intervallo fra i cicli estrali è di circa 150 giorni, mentre i Boston terriers e i boxer presentano un intervallo anche di 240 giorni (Duke, 2002).

La cagna normalmente raggiunge la pubertà tra i 6 ed i 12 mesi di età (2-3 mesi dopo il completo sviluppo corporeo) e questo intervallo varia a seconda della razza: solitamente quelle di piccole dimensioni raggiungono la pubertà prima delle razze di grossa taglia (Duke, 2002).

Il ciclo estrale può essere suddiviso in quattro fasi: proestro, estro, diestro ed anestro.

Proestro

Dopo un anestro di 3-5 mesi, la cagna entra in una fase di proestro che dura in media 9 giorni (con variazioni da 3 a 21 giorni) caratterizzata da crescita follicolare, ingrossamento della vulva e perdita di liquido siero-ematico a livello vaginale. Durante questa fase la cagna, pur attraendo i maschi, non accetta l'accoppiamento. In particolare nelle fasi iniziali del proestro il comportamento è simile a quello osservabile durante l'anestro: se un maschio si avvicina al posteriore della cagna, questa si gira, si solleva, ringhia e morde.

Avvicinandosi l'estro, questo comportamento tende ad attenuarsi: la risposta all'avvicinamento del maschio consiste nel tentativo di scappare, rannicchiarsi od eventualmente di passività.

Estro

Per convenzione, l'inizio dell'estro viene fatto coincidere con il momento in cui la femmina accetta di accoppiarsi.

L'estro dura in media 9 giorni (con variazioni da 2 a 27 giorni). Durante questa fase l'accoppiamento è favorito dal riflesso di immobilità: l'animale presenta il posteriore al maschio, si ha il riflesso di deviazione della coda, innalzamento del perineo ed esposizione della vulva in un modo paragonabile alla lordosi dei roditori. L'ovulazione mediamente avviene 2 giorni dopo l'inizio dell'estro. Dopo l'ovulazione si ha una fase di luteinizzazione della granulosa del follicolo che dura 2-3 giorni.

Nella cagna, al momento dell'ovulazione l'oocita non ha ancora estruso il primo globulo polare e quindi raggiunto la Metafase II. L'oocita termina il processo di maturazione nucleare nell'ovidotto 48-60 ore dopo l'ovulazione. La fecondazione in questa specie può avvenire anche tardivamente rispetto all'ovulazione. Questo tuttavia non è causa di infertilità poiché il seme canino rimane vitale nel tratto genitale femminile per circa 7-11 giorni. Anche il gamete femminile presenta una notevole longevità e dopo l'estrusione del primo globulo polare rimane fecondabile per 48 ore circa (Duke, 2002).

Diestro

Il diestro, che corrisponde al periodo di attività luteinica, dura circa 2 mesi ed è caratterizzato dalla presenza di corpi lutei ed elevati livelli di progesterone.

In caso di mancata gravidanza i corpi lutei regrediscono nell'arco di un periodo molto variabile (intorno ai 50 giorni) e si formano i corpi albicanti (Concannon et al., 1975).

Anestro

L'anestro corrisponde al periodo di inattività ovarica ed ha una durata variabile che dipende da numerosi fattori quali taglia, razza ed ambiente.

1.b La regolazione endocrina del ciclo estrale

L'inizio del proestro è caratterizzato da un aumento dei livelli ematici di estrogeni intorno ai 26 pg/ml (Concannon et al., 1975) che causano delle risposte fisiologiche dell'organismo molto importanti quali: iperemia del tratto riproduttivo, edema vulvare e perdite siero-ematiche.

Il picco nelle concentrazioni degli estrogeni (fino a 62 ± 4 pg/ml il giorno precedente il picco di LH; Concannon et al., 1975), avviene all'inizio dell'estro ed è il principale responsabile del picco preovulatorio di LH. Questo aumento preovulatorio di LH ha una durata di 18-48 ore e consiste in un aumento dei livelli di questo ormone anche 20-40 volte superiore rispetto a quelli osservabili durante le altre fasi del ciclo estrale: si passa infatti da 2-5 ng/ml a 20-50 ng/ml (Concannon et al., 1989).

La cagna ovula mediamente 24-48 ore dopo il picco di LH.

Subito dopo il picco preovulatorio di LH e l'ovulazione i livelli ematici degli estrogeni calano rapidamente. I livelli ematici di progesterone cominciano ad aumentare già poco prima dell'ovulazione (oltre i 5 ng/ml) e la determinazione del progesterone può essere utile per comprendere se l'animale sta ovulando.

I profili ematici del progesterone nella fase diestrale sono simili sia che si sia o che non si sia instaurata una gravidanza e passano da 5-10 ng/ml al momento dell'ovulazione a 15-30 ng/ml dopo una settimana. Nella cagne non gravide la funzionalità luteinica è massima per 25 giorni dopo l'ovulazione e poi declina fino alla fase anestrata.

Nella cagna, i cambiamenti che avvengono nel passaggio dalla fase anestrata al proestro sono numerosi: presenza di un gran numero di pulse di elevata

ampiezza ma bassa frequenza di GnRH, un aumento della sensibilità ipofisaria allo stesso ed un aumento della risposta alle gonadotropine a livello ovarico (Okkens et al., 2006). Un evento critico per l'inizio della follicologenesi è l'aumento delle concentrazioni plasmatiche basali di FSH e l'aumento della pulsatilità dell' LH. Oltre queste modificazioni nell'asse ipotalamo-ipofisi-ovaio è molto importante anche l'attività del sistema dopaminergico per dare inizio ad una nuova fase follicolare. Infatti la somministrazione di un agonista della dopamina (cabergolina o bromocriptina) riduce il periodo interestrile (Okkens et al., 2006).

1.c Ecografia ovarica nella cagna

Un elemento diagnostico fondamentale nello studio del ciclo estrale nella specie canina è rappresentato dall'indagine ecografica dell'ovaio.

Nei primi giorni del proestro, nell'ovaio, organo ecograficamente poco differenziabile dai tessuti circostanti, si iniziano ad intravedere i follicoli, che appaiono come strutture anecogene di 1-2 mm che si accrescono fino all'ovulazione raggiungendo i 6-10 mm di diametro. Lo sviluppo follicolare e l'ovulazione sono asincrone tra le due ovaie. La durata dell'ovulazione tra i primi e gli ultimi follicoli che ovulano può essere anche superiore alle 24 ore (Boyd et al.,1993). Il momento esatto dell'ovulazione non è ecograficamente ben identificabile in quanto solo il 6% dei follicoli collassano, il 32% dei follicoli non mostrano segni evidenti di modificazioni ed il 62% dei follicoli sono rimpiazzati da aree di tessuto moderatamente ipoecogeno senza una parete propria (England et al.,1993). Nelle fasi iniziali dello sviluppo del corpo luteo è spesso presente una certa quantità di liquido siero-emorragico che nell'arco di alcuni giorni viene completamente riassorbito. La presenza di liquido può far confondere ecograficamente i corpi lutei emorragici con follicoli antrali (Spattini et al., 2003). Le differenze, non facilmente rilevabili, sono date da un

modesto ispessimento della parete (più ecogena rispetto ad un follicolo) e, a volte, dalla presenza di materiale ipoecogeno fluttuante nella cavità che tende ad aumentare di ecogenicità col passare dei giorni. I corpi lutei dopo il quinto o sesto giorno dalla loro formazione, sono distinguibili dal parenchima ovarico in quanto appaiono come strutture rotondeggianti di 4-6 mm, parenchimatose ed ecogene con centro irregolarmente ipoecogeno. L'ovaio regredisce fino a tornare una struttura isoecogena rispetto ai tessuti circostanti in circa 20-30 giorni.

CAP.2 IL CONTROLLO ENDOCRINO DELL'ATTIVITÀ RIPRODUTTIVA NELLA GATTA

2.a Ciclo estrale nella gatta

La gatta domestica è un animale poliestrale stagionale ad ovulazione indotta. Si definisce poliestrale perché presenta cicli estrali che si susseguono durante la stagione riproduttiva; stagionale poiché la riproduzione è caratterizzata da un periodo di anestro dovuto al fotoperiodo. I cicli estrali si susseguono da Gennaio a Settembre e s'interrompono da Ottobre a Dicembre (Tsutsui et al., 2004; Duke 2002; Tsutsui et al., 1993). La gatta domestica è definita una specie ad ovulazione indotta poiché necessita dell'accoppiamento (o di una stimolazione meccanica della cervice) per il rilascio del picco preovulatorio di LH e l'ovulazione. Bisogna però precisare che è stato osservato che alcune gatte (anche il 30%) possono ovulare spontaneamente e cioè, senza che avvenga l'accoppiamento (Lawler et al., 1993).

Nella gatta l'intervallo tra nascita e primo estro (detto pubertà) può essere influenzato da numerosi fattori quali: l'ambiente, il periodo della nascita in relazione al fotoperiodo, la razza e fattori psicologici.

Il ciclo estrale può essere suddiviso in quattro fasi: proestro, estro, diestro (presente solo se vi è la formazione di corpi lutei) ed anestro (Fig.2.I).

Proestro

Il proestro ha una durata media di 1.5-2.0 giorni e durante questo periodo le femmine attraggono i maschi ma non accettano l'accoppiamento. Ci sono atteggiamenti tipici quali: sfregamento della testa e del collo, miagolii e rotolamento. È possibile osservare edema vulvare. Questo periodo è caratterizzato dallo sviluppo dei follicoli ovarici.

Estro

Nelle gatte l'estro dura in media 5-6 giorni (da un minimo di 2-3 ad un massimo di 18-20 giorni) (Root et al, 1995), dipende se l'animale si accoppia e dal momento in cui si accoppia. I caratteri distintivi dell'estro sono: anoressia, poliuria, emissione di un miagolio simile al pianto (per richiamare il maschio) e accucciamento con la regione pelvica alzata ed un movimento delle zampe ritmico (risposta lordotica). Una piccola quantità di liquido siero-ematico viene emesso a livello vaginale. È utile ricordare, però, come l'insieme degli atteggiamenti tipici dell'estro non rifletta sempre l'attività ovarica o la durata del ciclo riproduttivo. Infatti Wildt et al., (2004) riportano che una significativa attività follicolare può essere presente anche in gatte che non mostrano segni comportamentali di estro.

Se avviene l'accoppiamento e l'animale è gravido, i follicoli ovarici maturi ovulano e si formano i corpi lutei che rimangono attivi fino a poco prima del parto, altrimenti, se l'animale si è accoppiato ma non è gravido, i corpi lutei permangono per circa 40 giorni. Se l'accoppiamento non avviene, i follicoli non ovulano e diventano atresici e dopo circa 7-8 giorni si sviluppano dei nuovi follicoli e può iniziare un nuovo ciclo estrale. Per cui in questo caso l'intervallo tra un ciclo estrale e quello successivo si aggira intorno ai 14-19 giorni (Lawler et al.1993).

Diestro

Il diestro compare solo se è avvenuta l'ovulazione ed è caratterizzato dalla presenza di corpi lutei e di elevati livelli ematici di progesterone. Ha una durata di circa 35-40 giorni. Al diestro può fare seguito un nuovo ciclo estrale oppure un periodo di inattività ovarica (l'anestro).

Anestro

L'anestro stagionale è un periodo durante il quale non si ha attività ovarica e segni di comportamento sessuale. Solitamente dura 3-4 mesi, è determinato dal

fotoperiodismo (giornate a luce corta, Ottobre-Dicembre) e termina quando le giornate si allungano (fotoperiodismo positivo). Questo periodo può essere molto ridotto o addirittura assente nelle gatte allevate in ambiente domestico.

I meccanismi endocrini che controllano l'anestro stagionale nella gatta non sono ancora del tutto chiari. In letteratura è riportato che la melatonina riveste un ruolo inibitorio importante. Infatti, la somministrazione di melatonina (5 mg a giorni alterni) nella gatta anche in presenza di un fotoperiodo stimolante l'attività sessuale (12 ore di luce giornaliera per un periodo di 60 giorni) inibisce lo sviluppo dei follicoli ovarici (Leyva et al., 1989). Graham et al., (2004) hanno studiato l'influenza della melatonina sulla funzionalità ovarica spontanea o indotta mediante la somministrazione di gonadotropine: la somministrazione orale di melatonina (30 mg al giorno 3 ore prima del buio per 25 giorni) ha bloccato in maniera efficace (ma reversibile) l'attività ovarica anche quando le gatte sono state sottoposte ad un fotoperiodismo di 12 ore di luce e 12 di buio.

2.b La regolazione endocrina del ciclo estrale

Il ciclo estrale nelle gatte può, inoltre, essere suddiviso, come nelle altre specie domestiche, in una fase follicolare e in una luteinica. La prima è caratterizzata dallo sviluppo dei follicoli ovarici, alti livelli di estrogeni e bassi livelli di progesterone; la seconda dalla presenza di corpi lutei, di elevate concentrazioni ematiche di progesterone e bassi livelli di estrogeni.

La fase follicolare ha inizio con il proestro, dura generalmente 7 giorni ed è caratterizzata da elevati livelli ematici di estrogeni e da modificazioni anatomiche quali aumento della lunghezza del fornice uterino, diminuzione dell'altezza della vagina e riduzione dell'ampiezza dell'angolo formato dall'asse cervicale e vaginale (Zambelli et al., 2005).

Durante la fase follicolare i livelli ematici di estrogeni aumentano rapidamente, rimangono elevati per 3-4 giorni per poi decrescere nel giro di 2-3 giorni

(Goodrowe et al., 1989). Affinché l'ovulazione abbia luogo è necessario un picco di ormone luteinizzante (LH) che avviene in risposta all'accoppiamento o a seguito di una stimolazione cervicale. Bisogna precisare che la quantità di LH liberata come risposta alla stimolazione cervicale può essere limitata se viene effettuata con troppo anticipo (terzo o quarto giorno dell'estro) (Tsutsui et al., 1993).

In caso di mancato accoppiamento i follicoli che sono maturati nei 6-7 giorni della fase follicolare, non ovulano, e regrediscono spontaneamente. Segue poi un periodo di inattività ovarica che dura circa 8-9 giorni (Duke, 2002).

In caso di accoppiamento, l'ovulazione avviene 24-36 ore dopo il picco di LH e i follicoli che ovulano si trasformano in corpi lutei che, nel giro di 24-48 ore, secernono progesterone (Tsutsui et al., 1993). Inizia così la fase luteinica.

Se dopo l'accoppiamento si instaura una gravidanza, i livelli di progesterone aumentano nell'arco di 2-3 giorni e raggiungono un picco dopo 10-11 giorni. Si mantengono costanti per alcuni giorni, aumentano nuovamente dal 19°-21° giorno e poi vanno diminuendo fino a poco prima del parto quando subiscono un calo precipitoso. (Verhage et al., 1976; Schmidt et al., 1983; Goodrowe et al., 1989; Christiansen et al., 1984).

Se dopo l'accoppiamento non si instaura una gravidanza, si formano comunque i corpi lutei che rimangono attivi per circa 35-40 giorni. In questo caso i livelli ematici di progesterone raggiungono il picco massimo al 10°-15° giorno dall'accoppiamento e poi calano velocemente fino ai livelli basali 35-40 giorni più tardi. Questa fase è detta pseudogravidanza ma, a differenza della cagna, nella gatta la permanenza dei corpi lutei in assenza di gravidanza, non determina, se non in rari casi, la comparsa di sintomi clinici (Tsutsui et al., 1993).

2.c Ecografia ovarica nella gatta

L'apparato genitale femminile è costituito da: ovaie, ovidutto, utero, cervice, vagina e vulva. L'utero e le ovaie sono ben visibili all'esame ultrasonografico mentre la vagina e la vulva possono essere meglio valutate con l'ispezione visiva diretta o con studi radiografici con contrasto.

Le ovaie sono due organi parenchimali di piccole dimensioni, di forma ovalare, non sempre facilmente identificabili all'esame ecografico. Cambiano l'aspetto ecografico in relazione alla propria attività funzionale; perciò in alcuni periodi del ciclo estrale vengono reperiti con maggiore difficoltà. Sonde ecografiche ad alta frequenza (da 7.5 a 10 MHz) sono ideali per la valutazione di queste strutture.

L'ovaio, solitamente, è localizzato caudalmente rispetto al rene ipsilaterale. Per la ricerca dell'ovaio sinistro si opera una scansione longitudinale laterale sinistra con il paziente in stazione quadrupedale od in decubito destro; si segue l'aorta in direzione craniale, si individuano il polo vascolare ed il polo caudale del rene sinistro, quindi si cerca una scansione più laterale o mediale, diminuendo la pressione e portando il trasduttore appena caudalmente rispetto al polo renale. Se l'animale si trova in stazione quadrupedale le ovaie tendono a spostarsi ventralmente, sospese al mesovario.

Per il reperimento dell'ovaio destro sembra più utile il decubito laterale sinistro col dorso rivolto all'operatore. Nonostante l'ovaio si trovi piuttosto vicino alla parete addominale, questa posizione può essere utile per reperire come riferimento i vasi ed il rene destro, quindi si porta la sonda appena caudalmente seguendo a ritroso la vena cava e, diminuendo la pressione, si cerca una scansione poco più mediale.

Le dimensioni ovariche di una gatta sono leggermente inferiori a quelle di un cane di piccola taglia e sono costituite da una corticale esterna e da una

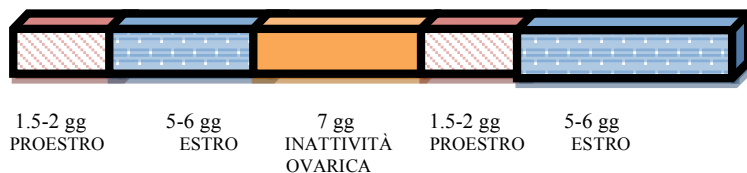
midollare interna. La corticale contiene i follicoli, costituiti da un oocita e cellule della granulosa. Il tessuto parenchimale dello stroma circonda i follicoli. Come precedentemente ricordato, l'aspetto ecografico delle ovaie cambia durante il ciclo estrale. Durante l'anestro e le prime fasi proestrali, appaiono piccole, di forma ovale o a fagiolo, e hanno una ecogenicità omogenea simile a quella della corticale del rene, a volte con margini indistinti. La corticale e la midollare non sono, solitamente, differenziabili nel gatto a differenza di quanto succede nella donna (Nyland et al., 2002).

Lo sviluppo follicolare inizia nel periodo proestrale, un liquido anecogeno riempie i follicoli che dopo l'ovulazione appaiono, invece come strutture solide ipoecogene: i corpi lutei.

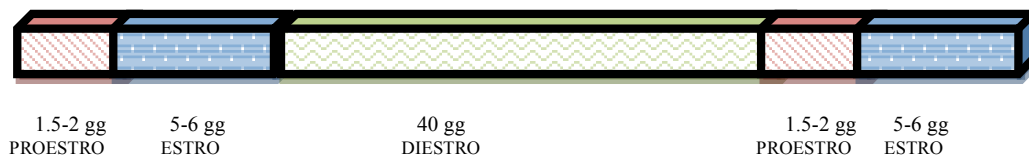
In uno studio eseguito su 18 gatte le dimensioni follicolari rientravano in un range che andava da 1.0 mm a 3.3 mm (diametro raggiunto dopo 8 giorni). Lo sviluppo luteale, invece, ha dato valori molto diversi: in generale si potevano riconoscere strutture anecogene di 1 mm di diametro entro 3 giorni dall'ovulazione che potevano raggiungere i 5.3 mm entro 5 giorni (Günzel-Abe et al., 1998). I corpi lutei compatti sono stati facilmente identificati come una struttura abbastanza omogenea che protunde dalla superficie ovarica. Quelli, invece, che si trovavano all'interno dell'ovaio non erano così ben identificabili.

Fig. 2.I Le fasi di attività riproduttiva nella gatta: A) che non si accoppia, B) che si accoppia ma non rimane gravida, C) che si accoppia e rimane gravida.

A) Gatta che non si accoppia



B) Gatta che si accoppia ma non rimane gravida



C) Gatta che si accoppia e rimane gravida



CAP.3 INDUZIONE DELL'ESTRO NELLA CAGNA E NELLA GATTA

3.a Induzione dell'estro nella cagna

I. INTRODUZIONE

Il cane è un animale monoestrale stagionale caratterizzato da un lungo anestro (3-5 mesi). Nell'allevamento canino la lunghezza del periodo anestrato è un fattore limitante sia per la gestione delle fattrici sia per la distribuzione delle nascite durante l'anno, entrambi elementi economici di estrema importanza. Vi è quindi la richiesta, da parte degli allevatori, di interventi farmacologici che siano in grado di ridurre l'intervallo interestrale.

Gli studi condotti sinora hanno utilizzato protocolli che si basano su composti ad azione diversa: gonadotropine ipofisarie, GnRH e suoi analoghi e soprattutto agonisti della dopamina (bromocriptina e cabergolina).

Analizzeremo di seguito ciascuna di queste sostanze soffermandoci sui meccanismi d'azione e sulla possibilità della loro utilizzazione nella pratica clinica.

II. AGONISTI DELLA DOPAMINA

Gli agonisti della dopamina utilizzati per l'induzione dell'estro sono: bromocriptina e cabergolina.

La bromocriptina, agonista dopaminico non selettivo, è generalmente utilizzata per sopprimere la lattazione delle cagne in corso di pseudogavidanza, ma è anche in grado di ridurre l'intervallo interestrale. Infatti un trattamento con bromocriptina (alla dose di 40 µg/Kg per due volte al giorno fino al proestro) iniziato entro i primi giorni della fase luteinica e proseguito fino al proestro successivo induce una riduzione dell'intervallo interestrale da 246 ± 8.0 giorni nei

soggetti di controllo a 123.3 ± 23.0 giorni nelle cagne trattate (Okkens et al., 1985).

Gli estri ottenuti con il trattamento a base di bromocriptina sono fertili: questo è stato dimostrato da Zöldag et al. (2001) che ha trattato 48 cagne in anestro prolungato (condizione patologica) con bromocriptina alle dosi di 0.3 mg/animale per 3 giorni e successivamente alla dose di 0.6-2.5 mg/animale a seconda della taglia fino alla comparsa dell'estro ottenendo un tempo medio di comparsa dello stesso di 19 giorni dall'inizio del trattamento con 82% di gravidanze (la dose veniva stabilita iniziando con dosi frazionali di 0.3 mg in cagne di peso inferiore ai 15 kg e 0.6 mg se superiori poi la dose veniva aumentata a 0.3mg BID e 0.6 mg BID fino alla comparsa di estro o qualora si manifestassero effetti collaterali quali vomito; nelle cagne di peso superiore ai 25 kg la dose di 0.6 mg BID veniva aumentata a 1.25 mg BID). Ricordiamo, però, che mentre il trattamento con bromocriptina condotto durante la fase anestrata è seguito da estro fertile, il trattamento effettuato durante la fase diestrata determina una riduzione dell'intervallo interestratale ma il calore, solitamente, non risulta fertile (Jeukenne et al., 1997).

Un altro agonista della dopamina utilizzato per l'induzione dell'estro è la cabergolina.

La cabergolina, come la bromocriptina, è un alcaloide derivato dall'ergot dotato di attività dopaminosimile ma, rispetto alla bromocriptina, è caratterizzata da una maggiore affinità per il recettore dopaminico D_2 e da una minore affinità per i recettori 5HT₂ per la serotonina (Muller et al., 1989). La cabergolina è, inoltre, dotata di minori effetti collaterali sul sistema nervoso centrale, quali vomito e nausea.

La somministrazione quotidiana di 5 µg/kg/giorno di cabergolina per os per un minimo di 7-10 giorni riduce l'intervallo interestratale con comparsa di estri fertili

e con tassi di gravidanza tra 93 e 100% (Jochle et al., 1989; Arbeiter et al., 1988).

È stato dimostrato che l'induzione dell'estro determinata dalla cabergolina è dipendente dalla fase anestrale in cui l'animale si trova: l'interruzione dell'anestro avviene prima in cagne trattate nella fase intermedia (123°-156° giorno di anestro) e tardiva (161°-192° giorno di anestro) rispetto al trattamento effettuato nella fase iniziale dell'anestro (93°-108° giorno di anestro) (Verstegen et al., 2001; Phillips et al., 2003).

In conclusione la cabergolina è attualmente considerata la molecola più efficace per indurre l'estro nella cagna, e l'efficacia del trattamento aumenta man mano che ci si allontana dal calore precedente.

Il meccanismo alla base dell'induzione di uno sviluppo follicolare e quindi del proestro da parte degli agonisti della dopamina non è stato del tutto chiarito. Probabilmente la somministrazione di bromocriptina induce un aumento delle concentrazioni plasmatiche di FSH senza un concomitante aumento di quelle dell'LH suggerendo quindi che l'azione dei dopamino-agonisti sullo sviluppo ovarico sia mediata da un aumento dell'FSH e non dell'LH (Kooistra et al., 1999).

In passato si considerava fondamentale per l'induzione dell'estro l'azione inibitoria da parte dei dopamino-agonisti sulla prolattina ma studi più recenti in cui sono state utilizzate in parallelo bromocriptina e metergolina, hanno confutato questa affermazione. Infatti la somministrazione di basse dosi di metergolina (0.1 mg/kg per os due volte al giorno), pur inducendo una significativa riduzione delle concentrazioni plasmatiche di prolattina (mediata dalla sua azione antiserotoninergica) non riduce l'intervallo interestrile; alte dosi (1 mg/kg per via intramuscolare o sottocutanea dal 90°-150° giorno dal calore ogni 3 giorni fino all'estro, solitamente per 9-15 giorni di trattamento) inducono l'estro pur non influenzando la prolattinemia (Tainturier et al., 1994).

Per cui la somministrazione di basse dosi di metergolina determina una riduzione delle concentrazioni di prolattina simile a quella ottenuta con un trattamento a base di bromocriptina (20 µg/kg) ma non è in grado di ridurre l'intervallo interestrile (Verstegen et al., 2001; Buff, 2002; Okkens et al., 1997). Inoltre Beijerink et al. (2003) hanno dimostrato che la bromocriptina può ridurre l'intervallo interestrile nella cagna anche a dosaggi molto bassi che non influenzano le concentrazioni plasmatiche di prolattina.

I dati sopra riportati dimostrano che l'induzione dell'estro da parte degli agonisti della dopamina non è determinata dalla soppressione della secrezione di prolattina ma da altri effetti dopaminergici diretti od indiretti sull'ovaio.

Tab. 3.I Protocolli a base di agonisti della dopamina: dosaggi e risultati sperimentali.

<i>Preparazione</i>	<i>Protocollo</i>	<i>Risultati</i>
<i>Bromocriptina</i>	<i>40 µg/Kg dall'inizio dell'estro fino a proestro seguente (3-4 mesi)</i>	<i>Riduzione dell'intervallo interestrile e tasso di gestazione del 62%.</i>
<i>Cabergolina</i>	<i>5µg/Kg per 7-10 giorni</i>	<i>Riduzione dell'intervallo interestrile e tassi di gestazione tra 93 e 100%.</i>

III. GONADOTROPINE

I fattori che regolano la durata dell'anestro nella specie canina non sono stati ancora del tutto chiariti ma l'aumento della concentrazione e della frequenza pulsatile dell'LH sono necessari perché inizi l'estro.

Sia l'LH che l'FSH stimolano lo sviluppo follicolare nel cane (Concannon 1993): la somministrazione di dosi farmacologiche di LH o di FSH è in grado di indurre l'estro ma con risultati molto variabili. La somministrazione di FSH

induce un 50-60% di proestro seguito da un 20-25% di estri caratterizzati da una percentuale di ovulazione del 30-40% (Shille et al., 1984). La somministrazione di LH porcino per 7 giorni tre volte al giorno induce il proestro in tutti gli animali trattati con tassi di gravidanza del 37.5% (Verstegen et al., 1997). Il tentativo di elaborare un protocollo di induzione dell'estro con dosaggi combinati di FSH e LH non ha dato risultati soddisfacenti. Probabilmente si ha una interferenza da parte dell'LH contenuto nei prodotti purificati o parzialmente purificati di FSH suino con l'LH endogeno (fenomeno di cross-reattività) (Bouchard et al., 1991).

Per l'induzione dell'estro nella cagna il PMSG o eCG (pregnant mare's serum gonadotropin o equine corionic gonadotropin), l'hMG (human menopausal gonadotropin) e l'hCG (human chorionic gonadotropin) hanno dato risultati migliori rispetto alla somministrazione di FSH e/o di LH (Shille et al., 1984).

La gonadotropina maggiormente studiata per indurre l'estro nella cagna è l'eCG. I protocolli che utilizzano questa sostanza sono molteplici e comprendono la somministrazione quotidiana o settimanale di eCG per via sottocutanea o intramuscolare. Il protocollo più utilizzato consiste nella somministrazione giornaliera per un periodo di 8-10 giorni di 20-500 UI/Kg di eCG per via sottocutanea o intramuscolare, seguita da una somministrazione di 500 UI di hCG per via intramuscolare (Archbald et al., 1980; Thun e al., 1977; Wright, 1982). I primi segni clinici di estro si osservano in media 10-15 giorni dopo l'inizio del trattamento, purtroppo però la percentuale di gravidanza è generalmente bassa (20-30%). A questi dati non entusiasmanti bisogna aggiungere il fatto che l'eCG può causare una reazione del sistema immunitario con la formazione di anticorpi anti-eCG. Inoltre l'utilizzo dell'eCG porta a concentrazioni di estrogeni eccessivamente elevate (anche quando somministrata per soli 5 giorni e a dosaggi molto bassi come 20 UI) che causano ovulazioni anormali, degenerazioni luteali precoci (forse legate alla mancanza di

un fattore luteotropo di origine uterina che si attiva 4 ore dopo l'ovulazione; Hadley, 1975) fino a effetti collaterali gravi quali: piometra, aborto e trombocitopenia (Buff, 2002).

Alcuni autori (Chakraborty et al., 1982) hanno valutato l'uso di un pre-trattamento a base di estrogeni per indurre il rilascio di LH o la formazione di recettori per l'LH nei follicoli preovulatori (ad esempio 100-300 µg di estrone al giorno per 5 o 6 giorni). Questi trattamenti devono, però essere associati a FSH o eCG per la follicologenesi e hCG o LH per indurre l'ovulazione.

Tab. 3.II Protocolli a base di gonadotropine: dosaggi e risultati sperimentali

<i>Preparazione</i>	<i>Protocollo</i>	<i>Risultati</i>
<i>eCG</i>	<i>20 UI/Kg/die im per 5 giorni poi 200 UI im di hCG il 5° giorno</i>	<i>80-90% estro e 50% gestazione</i>
<i>FSH</i>	<i>1-10 mg/die</i>	<i>0-50% estro e 0% gestazione</i>

IV. GnRH E SUOI ANALOGHI

La somministrazione di GnRH (Gonadotropin Releasing Hormone) o di suoi agonisti sintetici stimola, nella cagna, la secrezione di LH e FSH (Buff, 2002). È stato dimostrato che la somministrazione di GnRH esogeno (0.2-0.4 µg/Kg) ogni 70-90 minuti è in grado di determinare la sintesi ed il rilascio di LH e di FSH da parte dell'ipofisi in maniera del tutto simile alla secrezione endogena tipica della fine del proestro ed inizio estro (Hull et al., 1987).

Affinchè il GnRH determini alte percentuali di estri fertili, però, deve essere somministrato per più di 8 giorni e questo richiede l'uso di pompe ad infusione e

la necessità di ospedalizzare l'animale con conseguenti scarsa applicabilità nella pratica clinica e alti costi di trattamento.

L'utilizzo di mini pompe sottocutanee che contengono analoghi del GnRH (lutrelina, deslorelina, leuprolide) ha portato a percentuali di estro e di gravidanze sovrapponibili a quelli ottenuti con l'infusione endovenosa continua di GnRH (Trigg et al., 2006) (Tab.3.III).

In un recente studio (Volkmann et al., 2006) è stata valutata l'efficacia di pompe sottocutanee contenenti 2.1 o 1.05 mg di un analogo del GnRH (la deslorelina) a livello della sottomucosa vestibolare. Tutti gli animali trattati in anestro hanno mostrato segni di estro in 3-5 giorni dall'impianto e tassi di gravidanza tra il 67 ed il 70%, al contrario, gli animali trattati in diestro hanno mostrato, oltre ad una ridotta sensibilità al trattamento, bassi tassi di gravidanza (0-20%). Il motivo di queste differenze non è ancora chiaro.

La somministrazione prolungata di agonisti del GnRH per l'induzione dell'estro, può però determinare una prematura degenerazione luteale: probabilmente si verifica una sovrastimolazione ipofisaria, una riduzione della trascrizione dei recettori per il GnRH, una soppressione dell'LH con una ridotta risposta luteale allo stesso e conseguente riduzione della secrezione di progesterone (Kutzler, 2007).

Concludendo possiamo affermare che l'induzione dell'estro tramite somministrazioni ripetute di GnRH mostra buoni risultati ma è inattuabile a causa degli alti costi di gestione dell'animale. L'applicazione, invece, di impianti sottocutanei a base di agonisti del GnRH (lutrelina, deslorelina, leuprolide) sarebbe adatta alla pratica clinica per la facilità di utilizzo e la riduzione dello stress per l'animale ma è inattuabile a causa del prezzo degli impianti e l'uso di molecole non reperibili in commercio (Buff, 2002).

Tab. 3.III Protocolli a base di GnRH e suoi analoghi: dosaggi e risultati sperimentali

<i>Preparazione</i>	<i>Protocollo</i>	<i>Risultati</i>	
<i>GnRH</i>	<i>Infusione pulsatile iv ogni 90 minuti</i>	<i>Estro nel 60-100% casi</i>	<i>Percentuale di gravidanza tra 40 e 81% a seconda degli studi</i>
<i>Deslorelina</i>	<i>Impianti da 2.1 o 1.05 mg a livello della sottomucosa vestibolare</i>	<i>Estro in tutti gli animali trattati</i>	<i>Tassi di gravidanza molto variabili (tra 40 e 70% a seconda degli studi)</i>

V. CONCLUSIONI

Esistono diversi tipi di protocolli per indurre l'estro nella specie canina.

I trattamenti a base di agonisti della dopamina, soprattutto la cabergolina, presentano una estrema facilità di somministrazione, buone percentuali di successo nell'induzione dell'estro con tassi di gravidanza del 90-100%.

I protocolli che comprendono l'uso di preparazioni a lento rilascio a base di analoghi del GnRH sono sicuramente poco stressanti per l'animale ma esitano in tassi di gestazione molto variabili e sono di difficile attuazione nella pratica clinica a causa degli alti costi degli impianti e la necessità di ospedalizzazione dell'animale.

I protocolli che prevedono l'uso delle gonadotropine (eCG, FSH, LH) danno spesso risultati deludenti.

3.b Induzione dell'estro nella gatta

I. INTRODUZIONE

La gatta è un animale poliestrale stagionale ad ovulazione indotta. Lo studio della funzionalità riproduttiva della gatta è stato spesso utilizzato come modello per le specie selvatiche a rischio d'estinzione e per migliorare la funzionalità riproduttiva nella gatta domestica dato che si sta diffondendo sempre di più in Italia l'allevamento di razze feline pregiate.

L'induzione dell'estro e dell'ovulazione nella gatta è stata tentata usando diversi protocolli che si basano sull'utilizzo di: gonadotropine, agonisti della dopamina, GnRH e suoi analoghi ed infine antagonisti degli oppioidi.

II. GONADOTROPINE

Nella gatta domestica durante la stagione non riproduttiva si può indurre sviluppo follicolare somministrando FSH. Tsutsui et al. (2000) riportano che le ovaie rispondono in modo più prevedibile alla somministrazione di gonadotropine durante l'anestro rispetto alla stagione riproduttiva.

I protocolli comprendono somministrazioni quotidiane o due volte al giorno per 2-6 giorni consecutivi (le dosi solitamente utilizzate sono di 0.5-2 mg/die per 5 giorni e poi mezza dose il sesto giorno). L'estro compare nel 67-100% dei casi. L'uso di FSH, nella specie felina, però può dare risultati molto variabili probabilmente a causa della contaminazione di LH contenuto nell'FSH suino parzialmente purificato. Inoltre, dato gli effetti iperstimolatori dell'FSH, non bisogna superare i 5-6 giorni di trattamento e, nel caso in cui non si manifesti l'estro dopo 7 giorni dall'ultima somministrazione di FSH, bisogna attendere almeno 5-6 settimane prima di ripetere il trattamento (Chakraborty et al., 1982).
Altra gonadotropina usata per l'induzione dell'estro è l'eCG o PMSG (equine corionic gonadotropin o pregnant mare's serum gonadotropin). Questa sostanza ha sia attività LH-simile che FSH-simile ed è dotata di una lunga emivita

(persistenza in circolo di 120 ore), il che la rende particolarmente adatta alla specie felina in cui somministrazioni ripetute di un farmaco possono determinare un forte stress per l'animale con implicazioni negative sulla funzionalità riproduttiva. Una singola somministrazione di eCG è in grado di indurre la crescita follicolare e l'estro (Tsutsui et al., 2000). Va, però, ricordato che numerosi elementi quali l'età e la stagione richiedono una modifica dei dosaggi per indurre l'estro (Colby, 1970).

La somministrazione di eCG, nella gatta domestica, può dare alcuni effetti collaterali come: sviluppo di cisti follicolari, prematura luteinizzazione dei follicoli e alta percentuale di follicoli che non ovulano. Un ulteriore svantaggio dell'eCG consiste nella produzione di anticorpi e quindi nella riduzione della risposta ovarica al trattamento quando l'eCG viene somministrato troppo frequentemente (intervallo minimo consigliato tra due trattamenti successivi: 6 mesi; Chakraborty et al., 1982).

Per indurre l'ovulazione dopo il trattamento con eCG si possono somministrare 50 UI di hCG (human corionic gonadotropin). Come l'eCG, l'hCG è in grado di determinare la formazione di anticorpi antigonadotropine e quindi si consiglia di attendere almeno 6 mesi tra due trattamenti successivi (Swanson et al., 1995). Il trattamento con questa gonadotropina aumenta la risposta ovarica allo stimolo copulatorio (Goodrowe et al., 1987)

Tab. 3.IV Protocolli a base di gonadotropine: dosaggi e risultati sperimentali.

<i>Composto</i>	<i>Protocollo</i>	<i>Risultati</i>
<i>FSH +hCG</i>	<i>0.5 mg SID im per 5 giorni poi mezza dose al sesto giorno seguito da hCG 250 UI im al 6° e 7° giorno</i>	<i>Proestro ed estro nel 100% casi ed alte percentuali di gravidanza (fino al 100%) (Hadley, 1975)</i>
<i>ECG+hCG</i>	<i>100 UI sq una sola volta seguito da 50 UI hCG dopo 7 giorni</i>	<i>78% gravidanza (Cline et al., 1980)</i>

III. GnRH E SUOI ANALOGHI

Il GnRH (gonadotropin releasing hormone) ed i suoi analoghi sono stati studiati per indurre l'ovulazione nella gatta domestica. Anche se una sola iniezione di 5-25 µg/gatto di GnRH è in grado di determinare un aumento delle concentrazioni sieriche di LH in gatte domestiche ciclanti, sono necessarie 2 somministrazioni di GnRH a distanza di 12 ore al quarto giorno dell'estro per indurre un picco di LH sufficiente per indurre l'ovulazione (Swanson et al., 2001).

Nei felidi selvatici (*Neofelis nebulosa*) una sola somministrazione di leuprolide (analogo del GnRH) ha indotto l'ovulazione nel 25% e nell'86% dei casi; questa ampia variabilità è dovuta probabilmente al fatto che gli agonisti del GnRH hanno una influenza indiretta sull'ipofisi (Pelican et al., 2001 e 2004).

La somministrazione di GnRH mediante impianti a lento rilascio può determinare una inibizione del ciclo estrale per un meccanismo di downregulation sui recettori del GnRH.

IV. AGONISTI DELLA DOPAMINA

Alcuni agonisti della dopamina sono stati utilizzati per indurre l'estro nella specie felina.

In uno studio preliminare condotto da Zambelli et al. (1998) su un numero limitato di gatti europei (5 soggetti) la somministrazione di cabergolina (2.5µg/kg/die) per 8 giorni è stata in grado di anticipare il ritorno in calore.

V. ANTAGONISTI DEGLI OPPIOIDI

La somministrazione di naloxone, un antagonista degli oppioidi, nella gatta domestica inibisce il tono oppioidergico endogeno ed è in grado di indurre proestro (Aiudi et al., 2001). Il naloxone modula l'entrata del calcio attraverso i canali del calcio di tipo L. Il calcio ed il naloxone antagonizzano in sinergia il blocco degli oppioidi sul GnRH e competono direttamente con la proteina G per il legame sui recettori degli oppioidi, questo permette la trasduzione del segnale del GnRH e l'aumento dell'LH. Comunque è necessario un pretrattamento con hCG affinché aumentino i recettori per l'LH. Il protocollo prevede un pretrattamento con hCG (una sola iniezione sottocutanea di 1000 UI) seguito dalla somministrazione giornaliera per via intramuscolare di una soluzione contenente 0.4 mg/ml di naloxone sciolto in una soluzione al 20% di calcio gluconato alla dose di 0.1 ml/kg per 4 giorni. In uno studio condotto su 9 gatte trattate con hCG (1000 UI) e Ca-naloxone (0.1 ml/kg im) 8 (88.8%) si sono accoppiate ed hanno ovulato (Aiudi et al., 2001). Non sono stati osservati effetti collaterali.

VI. CONCLUSIONI

La somministrazione di gonadotropine (eCG) è in grado di indurre l'estro nella specie felina con interessanti risultati anche se spesso associati ad effetti negativi quali sviluppo di cisti follicolari ed alto numero di follicoli che non ovulano.

Gli agonisti della dopamina sembrano essere efficaci anche se purtroppo al riguardo è disponibile un solo studio su di un numero estremamente ridotto di gatte.

Buoni risultati si sono ottenuti con l'uso degli antagonisti degli oppioidi ma anche in questo caso gli studi sono molto limitati.

Le preparazioni a base di GnRH, invece, sono state studiate al solo scopo di indurre l'ovulazione.

CAP.4 IL SISTEMA DOPAMINERGICO, LA PROLATTINA ED IL CONTROLLO DELL'ATTIVITÀ OVARICA.

4.a Introduzione

La prolattina od ormone lattogeno è un polipeptide prodotto a livello dell'ipofisi anteriore dalle cellule lattotrope ma viene sintetizzato anche a livello del sistema nervoso centrale ed immunitario, utero e tessuti connessi alla gravidanza e dalla ghiandola mammaria.

Ha importanti funzioni connesse al comportamento ed al controllo dell'omeostasi ma anche alla riproduzione animale.

Lo stimolo da sempre riconosciuto causa del rilascio di prolattina è quello della suzione ma altri elementi sono coinvolti nella sua regolazione quali: luce, stimoli uditivi ed olfattivi e stress. Il principale ormone coinvolto nella regolazione della prolattina è rappresentato dalla dopamina ma anche altri fattori secreti a livello di ipotalamo, ipofisi ed organi periferici inibiscono o stimolano la secrezione di questo ormone (Freeman et al., 2000).

4.b Sintesi della prolattina

Il principale sito di sintesi della prolattina è rappresentato dalle cellule lattotrope dell'ipofisi anteriore. Queste rappresentano dal 20 al 50% della totalità della popolazione dell'adenoipofisi a seconda del sesso e dello stato fisiologico dell'animale. La loro distribuzione è stata ben descritta nel ratto dove queste si trovano nella porzione latero-ventrale del lobo anteriore e presentano una morfologia eterogenea (da angolari ad ovali) (Baker et al., 1978). Le cellule lattotrope mostrano anche una certa eterogeneità nella distribuzione all'interno del lobo anteriore e questo influenza la loro capacità di rispondere alle sostanze che stimolano la secrezione di prolattina.

Altro sito di sintesi della prolattina è rappresentato dall'ipotalamo: la secrezione ed il rilascio sono modulati dagli steroidi ovarici (infatti l'ovarioisterectomia

determina un abbassamento del contenuto ipotalamico di prolattina mentre la somministrazione di estrogeni lo fa rialzare). I fattori che regolano il rilascio di prolattina a questo livello sono numerosi (ad esempio l'angiotensina II).

Ulteriore sito di secrezione della prolattina è rappresentato dall'utero e dai tessuti associati alla gravidanza. La placenta produce molecole che hanno similitudini strutturali con la prolattina ipofisaria. La decidua locale determina il rilascio di prolattina oltre che di progesterone (questa secrezione non è stimolata dai fattori che determinano il rilascio di prolattina o PRF). Ancora non è del tutto chiaro il ruolo della prolattina nel liquido amniotico (forse osmoregolatore e/o di maturazione ed immunitario per il feto/embrione). Infine si ricordi come nel ratto anche l'utero non gravido sia fonte di prolattina (Walters et al., 1983).

La prolattina è stata riscontrata sia nelle cellule epiteliali della ghiandola mammaria in animali in lattazione sia all'interno del latte stesso (Nolin et al., 1976; Grosvenor et al., 1992).

Infine sembra che anche il sistema immunitario, in particolare timo, milza e linfociti producano una prolattina simile a quella ipofisaria (Devins et al., 1992).

Nei linfociti, in particolare, sono stati evidenziati numerosissimi recettori D₄ e D₅ (recettori per la dopamina).

Sono state descritte numerose isoforme dei recettori della prolattina nei diversi tessuti.

Questi recettori sono stati identificati nei siti più disparati: ghiandola mammaria ed ovario; sistema nervoso centrale (talamo, ipotalamo e plessi corioidei), ipofisi, cuore, polmoni, timo, milza, fegato, pancreas, reni, surrenali, utero, muscoli scheletrici e cute (Ali et al., 1991; Davis et al., 1989; Lesueur et al., 1991).

4.c Regolazione della secrezione della prolattina

I. INTRODUZIONE

Come descritto nel capitolo precedente, la secrezione di prolattina è influenzata da un gran numero di stimoli provenienti dall'ambiente esterno ed interno. I più importanti stimoli fisiologici che determinano un aumento della secrezione di prolattina a livello ipofisario sono: suzione, stress ed aumento dei livelli ematici di steroidi ovarici (soprattutto estrogeni). Tali stimoli sono trasdotti dall'ipotalamo che elabora un gran numero di fattori rilascianti (PRF) e di fattori inibenti (PIF) la prolattina. Nei mammiferi il controllo che l'ipotalamo esercita sulla secrezione di prolattina a livello ipofisario è prevalentemente inibitorio. Ma è anche coinvolto in un controllo stimolatorio acuto sia tramite rimozione della sua azione inibitoria sia tramite la sovrapposizione di brevi input stimolatori.

Infine, la secrezione di prolattina, è influenzata da regolazione autocrina e paracrina.

Le cellule lattotrope hanno un'elevata attività secretoria spontanea. Questo assunto, ormai universalmente accettato, va tuttavia ridimensionato in quanto la secrezione di prolattina a livello ipofisario è sotto il controllo tonico e prevalentemente inibitorio dell'ipotalamo.

La regolazione della secrezione di prolattina è determinata anche dallo stato fisiologico dell'animale.

II. REGOLAZIONE DA PARTE DEL SISTEMA NERVOSO CENTRALE

La dopamina

La dopamina rappresenta il maggiore fattore inibente la prolattina (PIF). Numerosi esperimenti hanno dimostrato che la dopamina inibisce il rilascio della prolattina sia in vivo che in vitro. Sono stati identificati recettori della

dopamina sulla membrana delle cellule ipofisarie, in particolare della sottoclasse D_2 della famiglia dei recettori della dopamina (Meador-Woodruff et al., 1989).

Utilizzando il metodo dell'amino-fluorescenza Dahlstrom e Fuxe (1964) hanno mappato e classificato da A_1 ad A_{15} le popolazioni di neuroni del sistema catecolaminergico in base alla distribuzione rostro-caudale all'interno del sistema nervoso centrale.

I neuroni dopaminergici del nucleo arcuato e paraventricolare dell'ipotalamo a livello medio-basale (rispettivamente A_{14} e A_{12}) rilasciano dopamina che arriva all'ipofisi mediante il sistema portale ipotalamo-ipofisario. Questi neuroni vengono distinti in tre sistemi anatomico-funzionali.

Il primo sistema prende il nome di TIDA (tuberoinfundibolar neurons) e i neuroni che lo compongono si localizzano primariamente nella parte dorsomediale del nucleo arcuato e si proiettano nella zona esterna dell'eminenza mediana dove rilasciano dopamina che passa nello spazio perivascolare che circonda i capillari del sistema portale ipotalamo-ipofisario. La dopamina rilasciata da questi neuroni è considerata la maggiore responsabile della regolazione fisiologica della secrezione di prolattina. Le funzioni di regolazione differiscono a seconda del sesso: nelle femmine l'attività basale dei TIDA ed anche la risposta alla prolattina sono maggiori che nel maschio (nel ratto maschio sono stati identificati oppioidi endogeni che determinerebbero un'inibizione tonica dei TIDA).

I TIDA presentano sia recettori D_1 che D_2 , coinvolti in numerosi meccanismi di trasduzione che mediano il controllo della dopamina sulla prolattina.

Il secondo sistema di neuroni dopaminergici è detto PHDA (periventricular hypophysial dopaminergic neurons), si trovano a livello del nucleo paraventricolare ipotalamico e terminano nel lobo intermedio.

L'ultima classe è rappresentata dai THDA (tuberohypophysial neurons) che si trovano nella parte rostrale del nucleo arcuato tra le due classi precedenti.

La secrezione di dopamina da parte dei neuroni dei sistemi THDA e PHDA, a differenza dei neuroni TIDA, è insensibile al livello di steroidi ovarici o testicolari circolanti e non c'è alcuna differenza di attività tra maschio e femmina.

Inoltre, recentemente si è osservato che la dopamina a dosaggi ridottissimi può stimolare, anziché inibire, la secrezione di prolattina. Questo apparente controsenso può essere spiegato in due modi: sarebbe la diminuzione della dopamina ad attivare la secrezione di prolattina oppure esisterebbero dei fattori supplementari di cui ha bisogno la dopamina per agire da PIF (un esempio sarebbe l'acido ascorbico). È stato osservato che la dopamina non è il solo fattore inibente la prolattina ma esistono altre sostanze (come la somatostatina) che contribuiscono al controllo inibitorio sulla secrezione di prolattina.

Queste sostanze prendono il nome di LRF (lactotroph responsiveness factor): sono fattori con ridotta od assente influenza sul rilascio di prolattina *per sé* ma esercitano importanti effetti sulla secrezione di prolattina alterando la risposta delle cellule lattotrope ai classici fattori ipotalamici inibenti o rilascianti.

Da un punto di vista biochimico numerosi meccanismi di trasduzione medierebbero il controllo dopaminergico della secrezione di prolattina. L'inibizione dovuta all'attivazione dei recettori D_2 è legata all'inibizione dell'adenilil ciclasi e del metabolismo dell'inositolo fosfato. L'attivazione dei recettori D_2 , poi, modifica almeno cinque differenti canali ionici.

I neuroni del sistema dopaminergico sono influenzati anche dalla prolattina stessa che agisce con un meccanismo di feed back. L'aumento dei livelli sierici di prolattina determina un aumento della sintesi di dopamina a livello ipotalamico. Recettori per la prolattina sono stati identificati in tutte le sottopopolazioni (TIDA, PHDA, THDA) dei neuroni ad azione neuroendocrina del sistema dopaminergico e tutte queste popolazioni sono attivate dalla prolattina.

L'interruzione dell'azione della dopamina è raggiunta primariamente dal suo riassorbimento effettuato da trasportatori che si trovano a livello delle terminazioni dei neuroni dopaminergici. L'attività di questi trasportatori a livello dei neuroni TIDA, THDA e PHDA è necessaria per eliminare la dopamina dai rispettivi spazi perivascolari e permettere, così, la secrezione di prolattina.

TRH

Il TRH è il principale fattore ipofisiotrofico in grado di stimolare la secrezione di TSH (Thyroid-stimulating hormone) da parte delle cellule ipofisarie. Ma è stato anche dimostrato che è in grado di stimolare il rilascio dose-dipendente di prolattina sia in vivo che in vitro (Hinkle et al., 1973).

Il TRH è un PRF (prolactin releasing factor), mentre il rilascio di prolattina e il TSH non sono correlati.

Il TRH determina una rapida secrezione di tipo bifasico di prolattina caratterizzata da un rapido innalzamento (entro 30 secondi) seguita da una seconda fase più duratura e di minor ampiezza.

Infine ci sono numerosi dati in letteratura sul fatto che alcuni antagonisti della dopamina possano potenziare l'effetto stimolante del TRH sulla secrezione di PRL (anche se in realtà il meccanismo deve ancora essere chiarito) (Haisenleder et al, 1986; Martinez et al., 1988).

Istamina

I primi studi condotti sul ruolo dell'istamina nell'influenzare la secrezione di prolattina rivelarono la sua azione stimolante (Tuomisto et al., 1985). Nonostante che il profilo farmacologico dei recettori che mediano gli effetti dell'istamina sulla secrezione di prolattina non sia ancora del tutto chiaro, sembra che i recettori H₂ ne siano i responsabili. Anche se rappresenta solo una parte del meccanismo di controllo l'azione dell'istamina sui neuroni TIDA del

sistema dopaminergico controlla la secrezione di prolattina direttamente ma anche indirettamente (Gibbs et al., 1979).

Infatti l'istamina è in grado di modulare il rilascio di sostanze coinvolte nella regolazione della secrezione di prolattina quali: la vasopressina, la noradrenalina, la serotonina, gli oppioidi endogeni e la dopamina.

Serotonina

Il ruolo della serotonina sul rilascio di prolattina è soprattutto quello di neurotrasmettitore, infatti anche se recettori per la serotonina sono presenti a livello di ipofisi anteriore, questa non stimola il rilascio di prolattina in vitro suggerendo che la sua azione è più di neurotrasmettitore che di neurormone.

La somministrazione intracerebroventricolare od endovenosa di serotonina o di un suo precursore determina un aumento de livelli plasmatici di prolattina nei ratti così come nell'uomo (indipendentemente dalle concentrazioni di dopamina a livello di circolo portale) (Kato et al., 1974; Lamberts et al., 1978). I livelli di serotonina presenti nella regione soprachiasmatica sono importanti nella regolazione della secrezione di prolattina, specialmente nel picco indotto dagli estrogeni (in ratti ovarioisterectomizzati). Recentemente, poi, è stato dimostrato il ruolo centrale del nucleo paraventricolare ipotalamico nel mediare il rilascio di prolattina indotto dalla serotonina in sinergia con altre strutture (Bagdy et al., 1996).

Adrenalina e noradrenalina

I dati riguardanti il ruolo dell'adrenalina nella regolazione della secrezione di ormoni a livello di ipofisi anteriore sono scarsi. Sembra, però, che la modulazione adrenergica, mediata appunto da adrenalina e noradrenalina, giochi un ruolo importante nella secrezione di prolattina indotta dallo stress ma i meccanismi alla base di questo controllo non sono ancora stati definiti (Hokfelt et al., 1974).

Acetilcolina

Nelle cellule GH₃ (cellule pituitarie lattosomatotrope) l'attivazione del recettore muscarinico da parte dell'acetilcolina fa diminuire la secrezione di prolattina; però questa viene rapidamente inattivata dall'onnipresente colinesterasi, sembra quindi improbabile che l'acetilcolina abbia un ruolo neuroendocrino nella secrezione di prolattina. Va comunque ricordato un effetto inibitorio che svolgerebbe tramite l'azione sui neuroni TIDA del sistema dopaminergico (Wojcikiewicz et al., 1984).

Studi recenti hanno, inoltre, ipotizzato che esisterebbero altri bersagli della modulazione colinergica nella secrezione di prolattina.

Ossitocina

L'ossitocina sintetizzata dai nuclei paraventricolare e supraottico è trasportata attraverso gli assoni fino all'ipofisi posteriore dove è immagazzinata in attesa di essere secreta. L'ossitocina secreta nei vasi portali ipofisari in una quantità 10-15 volte maggiore rispetto alla circolazione periferica ha alta affinità per i recettori che si trovano nel lobo anteriore dell'ipofisi e che sono simili a quelli uterini (Gibbs, 1984).

Alcuni studi hanno evidenziato un ruolo stimolatorio dell'ossitocina sul rilascio di prolattina ma questo effetto dipende dal momento in cui questa è secreta: l'aumento è stato evidenziato nei ratti maschi e nelle femmine ovarioisterectomizzate ma non nelle femmine in lattazione (Lumpkin et al., 1983). È stata addirittura osservata una diminuzione di prolattina stress-indotta nei ratti maschi legata all'ossitocina. Quindi sembra abbastanza chiaro come l'ossitocina agisca da PRF in alcuni stati fisiologici.

Bisogna, infine, considerare gli effetti centrali dell'ossitocina che sembra avere anche un ruolo stimolante nella regolazione dei neuroni TIDA che influenzano negativamente la secrezione di prolattina (Yuan et al., 1996).

Vasopressina

La vasopressina, così come l'ossitocina, è sintetizzata dai neuroni localizzati soprattutto nella divisione posteriore dei nuclei supraottico e paraventricolare. Gli assoni di questi neuroni passano attraverso l'eminenza mediana fino al lobo posteriore dell'ipofisi dove altri neuroni si proiettano nella zona esterna dell'eminenza mediana e terminano a livello di capillari da cui derivano i vasi portali.

Studi preliminari hanno indicato chiaramente che alterazioni nel bilancio idrico ed elettrolitico a livello di lobo neurale alterano la secrezione di prolattina (Dohanics et al., 1994; Hyde et al., 1989). A questo proposito studi condotti su pazienti con lesioni ipotalamiche e diabete insipido hanno suggerito un ruolo significativo della vasopressina e dei peptidi ad essa correlati nel regolare la

secrezione di prolattina. Questa azione positiva sul rilascio di prolattina è stata osservata, però, solo in vivo e non in vitro.

Famiglia secretina/VIP

Numerosi peptidi biologicamente attivi della famiglia secretina/VIP, come il VIP (vasoactive intestinal polipeptide), il peptide isoleucina-istidina (PHI) e il PACAP (pituitary adenylyl cyclase-activating polipeptide), possono modulare la secrezione della prolattina.

Il VIP è stato originariamente isolato dal piccolo intestino del maiale e la sua presenza è stata poi evidenziata a livello di nuclei paraventricolari ipotalamici e nell'eminenza mediana.

Il VIP e il peptide istidina isoleucina originano da un precursore comune e sono omologhi. Entrambi i peptidi sono secreti in quantità identica nel sangue portale dell'ipofisi.

Il VIP è in grado di stimolare il rilascio di prolattina sia in vivo che in vitro attraverso un'azione diretta sui recettori VIP localizzati nelle cellule dell'adenoipofisi (Bataille et al., 1979). Inoltre il VIP gioca un ruolo fondamentale nella regolazione autocrina della secrezione di prolattina in quanto può essere secreto dalle stesse cellule lattotrope. In analogia col VIP, il PHI può stimolare il rilascio di prolattina in vivo così come in cellule ipofisarie disperse.

Il PACAP, invece, ha un'azione inibente la secrezione di prolattina in quanto stimola l'attività dopaminergica ipotalamica (Huang et al., 1996). È interessante notare come nella pecora il PACAP inibisca la secrezione di prolattina agendo all'interno dell'eminenza mediana ipotalamica.

Oppioidi

La scoperta dei recettori per gli oppioidi negli anni '70 all'interno del sistema nervoso centrale determinò l'inizio della ricerca dei ligandi endogeni.

Gli oppioidi endogeni (EOP) si dividono in 3 famiglie peptidiche separate: encefaline, dimorfine ed endorfine, codificate da 3 geni separati (Akil et al., 1984). Basandosi sulle caratteristiche farmacologiche e la risposta biologica che determinano sono stati identificati 3 gruppi di recettori per gli oppioidi (μ , δ e κ).

I neuroni che producono le encefaline sono i più numerosi e si trovano, a livello ipotalamico, soprattutto nei nuclei sopraottico e paraventricolare e si spingono fino alla neuroipofisi.

I neuroni che producono endorfine, invece, sono distribuiti praticamente solo a livello ipotalamico medio-basale e nel tronco encefalico.

Una grande quantità di dati ottenuti utilizzando numerosi agonisti degli oppioidi indica che gli oppioidi endogeni giocano un ruolo fondamentale nel regolare la secrezione di prolattina. I sottotipi di recettori per gli oppioidi che mediano

l'effetto degli agonisti sulla secrezione di prolattina sono soprattutto il tipo μ e κ (Krulich et al., 1986).

Studi recenti hanno rinforzato il concetto secondo cui gli oppioidi endogeni contribuiscono alla secrezione di prolattina indotta dalla suzione inibendo i neuroni dopaminergici dell'ipotalamo (Arbogast et al., 1998). Inoltre gli oppioidi endogeni mediano il picco notturno di prolattina in ratti in corso di pseudogavidanza.

Gli oppioidi endogeni e gli agonisti degli oppioidi sopprimono l'attività dei neuroni TIDA, presumibilmente attivando i recettori μ e κ in situazioni di stress. È stato ampiamente dimostrato che alcuni elementi del circuito neurale che regola la secrezione di prolattina sono particolarmente sensibili agli steroidi ovarici e surrenalici. È stato osservato che alte concentrazioni di prolattina inibiscono la secrezione di GnRH mentre stimolano il rilascio di β -endorfine, suggerendo un ruolo di mediatore degli oppioidi endogeni tra iperprolattinemia e diminuzione di GnRH (Calogero et al., 1994).

L'ambiente ormonale presente è importante nel determinare la regolazione della secrezione di prolattina da parte degli oppioidi endogeni.

Angiotensina II

Ottapeptide prodotto a partire da precursori inattivi quali angiotensinogeno ed angiotensina I.

L'angiotensina II è prodotta sia localmente che a livello sistemico da diversi tessuti quali: endotelio vascolare, cuore, cervello, ipofisi, ovaio e surrenali. È importante nella regolazione della pressione sanguigna, tono vascolare ed omeostasi idrico-salina e può influenzare la crescita, la migrazione, la differenziazione e l'apoptosi cellulare nei diversi tessuti (Bottari et al., 1993; Ferguson et al., 1998; Savedra, 1992).

Numerose osservazioni indicano che l'angiotensina II contribuisce alla regolazione fisiologica della secrezione di prolattina agendo sia a livello ipotalamico che ipofisario.

Quando viene somministrata a livello centrale l'angiotensina ha un effetto inibitorio sulla secrezione di prolattina nei ratti, indipendentemente dallo stato endocrino dell'animale (Myers et al., 1989 e 1991).

D'altro canto, il sistema dell'angiotensina endogena nell'ipotalamo non sembra coinvolto nel mantenimento dei bassi livelli di prolattina basale; sembra che l'azione sia solo di limitare l'ampiezza della secrezione di prolattina in risposta a stimoli ambientali ed endogeni.

Alcuni studi, poi, suggeriscono che i recettori per l'angiotensina che si trovano a livello ipotalamico (AT_1) partecipino al feed-back degli steroidi ovarici sulla secrezione di prolattina (Savedra, 1992; Steele, 1992).

Sostanza P

La sostanza P e i peptidi correlati (neurochinina A e B) sono membri della famiglia dei peptidi tachichinine.

Anche se questi peptidi sono stati ritrovati in diversi tessuti, essi sono espressi soprattutto a livello neuronale e sembra che la loro funzione primaria sia quella di neurotrasmettitori (Khawaja et al., 1996).

Numerosi studi suggeriscono che la sostanza P potrebbe agire da neurotrasmettitore nel nucleo arcuato e in altre parti dell'ipotalamo e che sarebbe coinvolta nella regolazione della secrezione di prolattina (Tsuruo et al., 1983).

Inoltre la sostanza P potrebbe modulare il rilascio da parte di neurormoni presinaptici di PIF e PRF a livello di eminenza mediana. Infine la presenza abbastanza cospicua di sostanza P nelle fibre della zona esterna dell'eminenza mediana potrebbe indicare un ruolo di questa sostanza come neurormone che raggiunge le cellule lattotrope dell'ipofisi attraverso il circolo portale (infatti a livello ipofisario sono stati localizzati numerosi siti di legame per la sostanza P) (Rivier et al., 1977).

Il meccanismo neuronale attraverso cui la sostanza P e gli altri membri della famiglia tachichinine e neurochinine esercita la sua azione è ancora sconosciuto.

Galanina

La galanina è un peptide costituito da 29 amminoacidi, ampiamente distribuita nel sistema nervoso centrale e periferico.

La presenza massiccia e la distribuzione specifica dei neuroni che secernono galanina nell'ipotalamo suggeriscono una sua importante funzione nella regolazione neuroendocrina della secrezione dell'ormone adenoipofisario (a questo proposito ricordiamo che la galanina è ampiamente espressa all'interno dell'ipofisi).

La galanina è in grado di stimolare la secrezione di prolattina da parte delle cellule ipofisarie e recenti osservazioni hanno evidenziato un ruolo nella regolazione paracrina e/o autocrina ipofisaria (Wynick et al., 1993).

Gli esperimenti condotti suggeriscono che l'effetto della galanina sul rilascio di prolattina deriva da una sua azione a livello ipotalamico, in quanto altera gli output stimolatori ed inibitori del circolo che regola la secrezione della stessa.

La galanina agisce stimolando la secrezione di prolattina tramite elementi quali la serotonina, elementi α_2 adrenergici ed oppioidi (Horvath et al., 1995; Koshiyama et al., 1990).

Neurotensina

La neurotensina è un peptide costituito da 13 amminoacidi, isolato in origine dall'ipotalamo bovino (Carraway et al., 1973).

Neurotensina e dopamina si trovano associati in grande quantità a livello di neuroni arcuati e periventricolari ipotalamici ed inoltre la neurotensina è presente a livello di eminenza mediana e lobo anteriore ipofisario.

Numerose osservazioni riportano che la neurotensina è in grado di influenzare le cellule lattotrope in vitro (Enjalbert et al., 1982). A livello endogeno sembra avere effetti opposti se somministrata a livello periferico (aumento) o intracerebroventricolare (diminuzione). A livello fisiologico sembra che la neurotensina agisca stimolando i neuroni TIDA inibendo, quindi, la secrezione di prolattina ma che a livello periferico (ipofisi) abbia invece una azione stimolante la secrezione di prolattina (McCann et al., 1992).

Infine ricordiamo che l'espressione del gene per la neurotensina è regolato dagli ormoni steroidei (Watanobe et al., 1993).

Neuropeptide Y

Il neuropeptide Y è un membro della famiglia dei polipeptidi pancreatici.

Questo peptide stimola la secrezione di prolattina in cellule ipofisarie di femmine di ratto ciclanti mentre determina una riduzione della stessa in animali in lattazione od ovarioisterectomizzati (Chabot et al., 1988).

La sua azione a livello endogeno sembra di inibizione sulla secrezione di prolattina grazie ad una stimolazione dei neuroni TIDA a livello ipotalamico (Wang et al., 1996).

Somatostatina

La somatostatina è un tetradecapeptide in grado di inibire non solo il GH ma anche la secrezione di prolattina, TSH e ACTH (Patel et al., 1986; Reichlin, 1984; Vale et al., 1974).

I neuroni che rilasciano somatostatina sono ampiamente distribuiti nel sistema nervoso centrale e periferico, sono ben rappresentati a livello ipotalamico e ricevono abbondanti afferenze da neuroni che rilasciano galanina, neurotensina, neuropeptide Y, GABA, serotonina, encefaline, sostanza P, TRH e dal sistema catecolaminergico (Abe et al., 1981; Bertherat et al., 1995; Halasz, 1994).

La somatostatina inibisce, così come GH, la secrezione di prolattina in vitro.

L'estradiolo, così come altri secretagoghi prolattinici, sarebbe in grado di alterare la risposta delle cellule lattotrope alla somatostatina. Inoltre sembra che la somatostatina influenzi negativamente la secrezione di prolattina agendo sul rilascio/sintesi di galanina (importante PRF).

Infine ricordiamo che, data la presenza della somatostatina e dei suoi recettori a livello di sistema nervoso centrale, è ovvio pensare ad un suo ruolo come neurotrasmettitore (forse potrebbe influenzare i neuroni TIDA).

Calcitonina

La calcitonina è un polipeptide secreto nella ghiandola tiroide che ha dimostrato la capacità di inibire la secrezione di prolattina (Sibilia et al., 1989). La calcitonina è in grado di inibire sia la secrezione basale di prolattina che quella indotta dal TRH agendo direttamente sulle cellule ipofisarie.

Gli effetti inibitori della calcitonina sulla secrezione di prolattina possono variare, infatti in pazienti tiroidectomizzati la somministrazione di calcitonina stimola, invece che inibire, la secrezione di prolattina.

Numerosi esperimenti condotti con tecniche RIA e immunoblotting su cellule ipofisarie dimostrano che la calcitonina è soprattutto un inibitore fisiologico della prolattina e agisce in sinergia con dopamina ed altri PIF provvedendo ad una inibizione tonica della secrezione di prolattina (Sortino et al., 1993).

È stato, infine, ipotizzato che la calcitonina possa agire da neuromodulatore a livello di sistema nervoso centrale e che possa determinare diminuzione della secrezione di prolattina attivando il sistema TIDA ma il ruolo fisiologico preciso della calcitonina nella regolazione della secrezione di prolattina è ancora sconosciuto. Infatti i meccanismi collegati ai recettori della calcitonina nelle cellule lattotrope non sono ancora del tutto chiari.

Peptidi simili alla bombesina

I primi rappresentanti di questa famiglia peptidica, bombesina e ranatensina, sono stati isolati dalla cute degli anfibii e poi sono stati seguiti dai loro analoghi nei mammiferi: GRP(gastrin-releasing peptide) e neuromedine B e C (Minamino et al., 1988; Walsh et al., 1979).

Questi peptidi sono localizzati a livello di neuroni ipotalamici. Nei ratti se somministrati a livello intracerebroventricolare sono potenti inibitori sia della secrezione di prolattina basale che di quella indotta. Gli studi condotti, invece, su colture cellulari ipofisarie hanno dimostrato un aumento della secrezione di prolattina in seguito alla somministrazione di bombesina. Questi risultati indicano come la bombesina agisca come inibitore del rilascio di prolattina non attraverso una azione diretta sulle cellule lattotrope ma aumentando il tono inibitorio dopaminergico (Bjoro et al., 1987; Drust et al., 1984; Sutton et al., 1982).

Colecistochinina

La colecistochinina (CCK) è stata descritta originalmente come un ormone gastrointestinale ma è stata poi isolata anche a livello di sistema nervoso centrale con funzioni di neurotrasmettitore.

Un gran numero di studi farmacologici e fisiologici supportano la nozione che la gastrina (appartenente alla stessa famiglia peptidica della colecistochinina) e i peptidi simili alla CCK giocano un ruolo fondamentale nella regolazione della funzionalità ipofisaria, inclusa la secrezione di prolattina.

Da studi condotti in vitro si è dimostrato che la CCK-8 determina un rilascio di prolattina da parte di cellule lattotrope (Malarkey et al., 1981). In vivo, invece, la CCK influenza la secrezione di prolattina agendo a livello ipotalamico stimolando neuroni che rilasciano sia PIF che PRF.

Dati ottenuti dall'elettrofisiologia, poi, supportano l'ipotesi che la CCK sia un importante neurotrasmettitore coinvolto nella regolazione della funzionalità neuroendocrina ipotalamica (effetto che appare influenzato dagli estrogeni) (Lin et al., 1993; Pan et al., 1986).

I peptidi simili alla colecistochinina agiscono come neurotrasmettitori o neuromodulatori a livello ipotalamico e giocano un ruolo importante nella regolazione della secrezione di prolattina. Il più importante sito di azione di questi peptidi è rappresentato dalla zona nucleo arcuato-eminenza mediana.

Peptide natriuretico atriale

Il peptide natriuretico atriale fu isolato primariamente dal tessuto cardiaco dei mammiferi.

Successivamente corpi cellulari positivi alla ricerca di questo peptide sono stati isolati nell'ipotalamo rostrale e questi si proiettano nell'eminenza mediana e nella neuroipofisi.

Anche se molti dati suggeriscono un'influenza del peptide a livello ipotalamico (stimola i neuroni dopaminergici) nella regolazione della secrezione di prolattina, non può essere esclusa una azione diretta a livello ipofisario in quanto questo peptide si è dimostrato capace di inibire la secrezione di prolattina in vitro (Duvilanski et al., 1995).

Recenti studi hanno ipotizzato il maggior ruolo del peptide natriuretico atriale ipotalamico nel modulare la secrezione stress-indotta di prolattina a livello ipofisario (Franci et al., 1992).

Infine si ricordi che una funzione complementare del peptide natriuretico atriale e della prolattina è quella di mantenere l'omeostasi idrica e salina (soprattutto del sodio).

Endotelina

La funzione primariamente associata alle endoteline era quella di agire da segnali di regolazione paracrina emessi dall'endotelio per influenzare il tono della muscolatura liscia. È però ormai noto che questi peptidi rivestono una grande quantità di funzioni fisiologiche e modulano numerose funzioni secretorie in diversi tessuti endocrini.

Numerosi studi riportano che i peptidi simili all'endotelina sono coinvolti nella regolazione della secrezione di prolattina. Le endoteline agiscono direttamente sulle cellule lattotrope determinando un aumento o una diminuzione della secrezione di prolattina a seconda dell'ambiente fisiologico (Kanicska et al., 1998 e 1993; Samson et al., 1990).

Recenti osservazioni indicano, inoltre, che i peptidi simili alle endoteline rivestono un ruolo di neurotrasmettitori e di neuromodulatori. A causa dell'elevato numero di recettori per le endoteline (tipo ET_A) a livello di neuroni dopaminergici sembra ragionevole supporre che le endoteline influenzino la secrezione di prolattina agendo sull'attività dei suddetti neuroni (Kurokawa et al., 1997).

Alcuni esperimenti suggeriscono, infine, una funzione inibitoria rivestita dalle endoteline nella regolazione dell'ossitocina e/o vasopressina, o forse indirettamente, nella secrezione di prolattina.

“Nuovi” peptidi che determinano il rilascio di prolattina

Recentemente con l'uso della PCR è stato isolato dall'ipofisi umana un “recettore orfano” (hGR3) detto così perché non sono stati identificati ligandi endogeni (Hinuma et al., 1998).

Successivamente, grazie a esperimenti condotti su cellule di Hamster e bovine, è stato possibile isolare detti ligandi.

I due peptidi isolati (di 20 e 31 amminoacidi rispettivamente) stimolano il rilascio di prolattina da parte delle cellule ipofisarie di ratto ma non influenzano la secrezione di nessun altro ormone a questo livello. Questi peptidi sono stati localizzati anche nel sistema nervoso centrale e nell'intestino e i recettori specifici anche a livello di midollare del surrene, quindi probabilmente queste sostanze sono coinvolte nel meccanismo di feedback centrale neuroendocrino che lega questi organi.

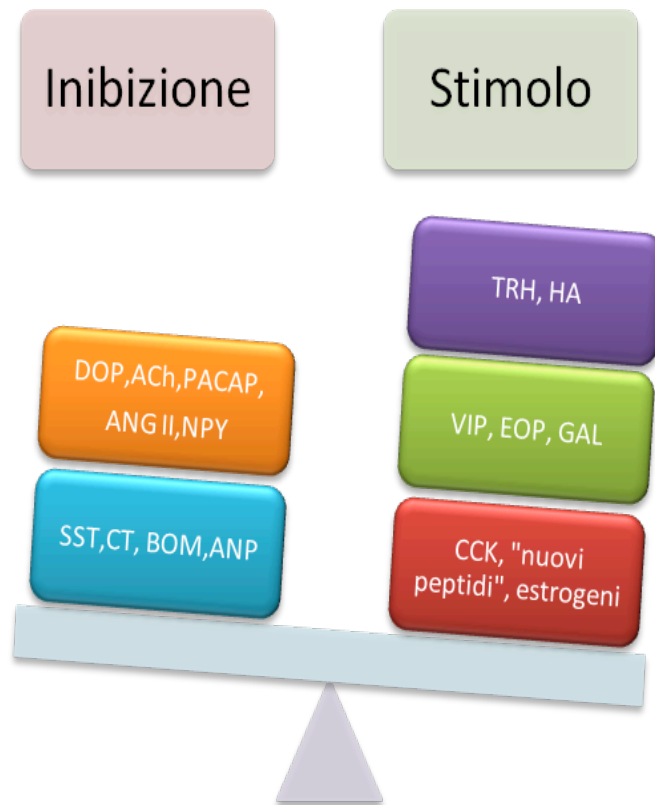
Va comunque precisato che non si sa ancora se questi peptidi abbiano la funzione di neuroormoni o se siano coinvolti nel controllo di tipo paracrino od autocrino.

Amminoacidi

Il gruppo degli amminoacidi che includono glutammato, aspartato, glicina, e GABA, e forse acido omocisteico e taurina costituiscono la più diffusa famiglia di neurotrasmettitori del sistema nervoso centrale dei mammiferi (Dingledine et al., 1990).

La maggior parte degli stimoli eccitatori è legato al glutammato mentre quelli inibitori sono legati al GABA.

Fig. 4.I Sostanze che inibiscono o stimolano il rilascio di prolattina (DOP: dopamina, HA: istamina, EOP: endorfine ed peptidi analoghi, GAL: galanina, SST: somatostatina, CCK: colecistochinina-8, Ach: acetilcolina, TRH: thyrotropin releasing hormone, VIP: polipeptide vasoattivo intestinale, PACAP: peptide ipofisario che attiva l'adenilato ciclasi, ANG II: angiotensina 2, NPY: neuropeptide Y, CT: calcitonina, BOM: peptidi simili alla bombesina, ANP: peptide natriuretico atriale).



III. REGOLAZIONE IPOFISARIA PARACRINA ED AUTOCRINA

Al fianco della intricata regolazione determinata dall'ipotalamo e dalle ghiandole endocrine periferiche, la secrezione di prolattina è influenzata anche da meccanismi di regolazione locale.

L'ipofisi anteriore ha una capacità intrinseca di regolazione attraverso segnali di tipo paracrino ed autocrino in grado di influenzare fortemente le cellule lattotrope.

La regolazione cellulare è detta autocrina quando il secreto della cellula regola la sua stessa secrezione. Nel caso, invece, della comunicazione paracrina il secreto è trasportato dal fluido extracellulare ed esercita un effetto biologico su una cellula bersaglio ad una certa distanza. Un particolare tipo di regolazione paracrina è rappresentata dalla giustacrina in cui la cellula d'origine e quella bersaglio sono adiacenti. Inoltre ricordiamo che le cellule lattotrope a contatto tra loro possono interagire tramite *gap junctions*.

Numerosi peptidi che sono in grado di modulare la secrezione di prolattina sono stati localizzati a livello ipofisario, è quindi ragionevole pensare che anche molecole sintetizzate localmente più che essere trasportate dal circolo portale possono regolare la secrezione di prolattina.

La lista dei peptidi in grado di agire come regolatori della secrezione di prolattina è in continuo aumento e i più importanti sono: galanina, VIP, endoteline, prolattina (inibisce la sua stessa secrezione attivando i neuroni dopaminergici), l'angiotensina II, la sostanza P, numerosi fattori di crescita, la calcitonina, il TRH, alcune citochine (IL-6), il GnRH, l'acetilcolina e fattori secreti dalle cellule follicolostellate (Houben et al., 1994).

Esistono numerose testimonianze in letteratura del fatto che la neuroipofisi e il lobo intermedio siano in grado di influenzare le cellule lattotrope (Ben-Jonathan et al., 1992). Le sostanze prodotte da queste due strutture raggiungono l'adenoipofisi attraverso i vasi di un circolo vascolare presente tra ipofisi

anteriore e ipofisi intermedia e posteriore. Le comunicazioni tra il lobo intermedio, la neuroipofisi e l'adenoipofisi sono sia neuroendocrine che endocrine.

Numerose osservazioni suggeriscono che la dopamina, l'ossitocina, la vasopressina e l' α -MSH (α -melanocyte-stimulating hormone) dopo essere stati rilasciati a livello della neuroipofisi e del lobo intermedio raggiungono l'adenoipofisi e partecipano al controllo della secrezione di prolattina.

IV. REGOLAZIONE LEGATA AD ORGANI PERIFERICI

L'ovariectomia ha un effetto importante sulle cellule lattotrope (Tougaard et al., 1994). La rimozione delle ovaie è seguita da una diminuzione della grandezza e del numero delle cellule lattotrope e dei granuli di prolattina in essi contenuti. L'estradiolo è l'ormone ovarico principale in grado di antagonizzare questi effetti e di conseguenza di stimolare la secrezione di prolattina (Chen et al., 1970).

L'estradiolo influenza la secrezione di prolattina a due livelli: direttamente a livello ipofisario, controlla l'espressione del gene della prolattina e modifica la sua sensibilità agli stimoli fisiologici che regolano la secrezione di prolattina; inoltre all'interno dell'ipotalamo, l'estradiolo modifica l'attività dei neuroni in grado di controllare la secrezione di prolattina.

È stato poi ipotizzato che l'estradiolo sia responsabile della differenziazione delle cellule lattotrope a partire da cellule totipotenti, effetto che viene mediato anche dal lobo neurointermedio ipofisario (Boockfor et al., 1986).

Gli estrogeni modificano la risposta delle cellule lattotrope di ratto agli inibitori e stimolatori fisiologici della prolattina. L'estradiolo è un antidopaminergico, quindi la dopamina ha un minor effetto inibitorio quando le cellule lattotrope sono esposte all'estradiolo. Apparentemente l'estradiolo agisce facendo diminuire il numero dei recettori per la dopamina (Raymond et al., 1978). Al

contrario aumenta la sensibilità delle cellule lattotrope al TRH (aumenta il numero dei recettori specifici).

La concentrazione di dopamina nel circolo portale diminuisce in corrispondenza dell'inizio del rilascio pre-ovulatorio di prolattina tipica del proestro della femmina di ratto.

Non è stato ancora stato descritto, invece, un ruolo diretto del progesterone sulla sintesi ed il rilascio di prolattina. Alcuni studi non riportano alcun effetto sulla secrezione di prolattina in risposta al progesterone mentre altri descrivono un aumento o addirittura una diminuzione.

Un aspetto raramente discusso riguardante le influenze inibitorie che agiscono sull'adenoipofisi riguarda il ruolo che rivestirebbero le ghiandole surrenali.

È noto infatti che i livelli di prolattina aumentano significativamente dopo asportazione delle ghiandole surrenali e che gli effetti possono essere contrastati dalla somministrazione di corticosteroidi (Aylsworth et al., 1979; Ben-David et al., 1971; Brann et al., 1990; Chen et al., 1976).

La somministrazione di desametasone in femmine di ratto in lattazione blocca in maniera reversibile il picco di prolattina indotto dalla suzione ad ulteriore riprova del ruolo dei corticosteroidi nella regolazione dell'ormone adenoipofisario (Carretero et al., 1997).

Ricordiamo, infine, che i glucocorticoidi influenzano anche la differenziazione e la morfologia delle cellule lattotrope.

Numerose osservazioni riportano che nel ratto la placenta produce una sostanza simile, come attività biologica, alla prolattina ipofisaria. Questa sostanza (detta ormone lattogeno placentare) oltre a mantenere la gravidanza e preparare la mammella per la lattazione, gioca un ruolo fondamentale nel regolare la secrezione di prolattina ipofisaria.

Recenti studi hanno osservato che l'ormone lattogeno placentare determina un calo del picco di prolattina nei ratti gravidi o pseudo-gravidi o di quello legato

alla suzione ma non influenza la secrezione ante-partum. Questo implica alcune alterazioni che avverrebbero all'interno dell'asse ipotalamo-ipofisario in grado di modificare la risposta all'ormone lattogeno placentare (Flietstra et al., 1997; Grattan et al., 1991).

Infine ricordiamo che l'ormone lattogeno placentare non agisce solo a livello ipofisario ma anche a livello ipotalamico (nell'uomo attiva i neuroni TIDA).

Anche l'utero non gravido è in grado di influenzare la secrezione di prolattina. È stato osservato ormai da tempo che l'asportazione dell'utero determina un aumento del periodo di vita dei corpi lutei in un gran numero di mammiferi. In molti, questo fenomeno è stato attribuito alla rimozione di un fattore luteolitico di origine uterina. Nell'uomo, nel ratto, nella pecora e nel coniglio questo fattore è stato identificato con le prostaglandine $F_{2\alpha}$ (Niswender et al., 1994). Comunque esistono dati che indicano come anche l'utero contribuisca alla luteolisi deprimendo la secrezione della prolattina che sappiamo essere luteotrofica. L'utero secerne un fattore nel sangue periferico che agisce direttamente sulle cellule lattotrope inibendo la secrezione di prolattina.

È ormai noto che lo stato nutrizionale dell'animale e la capacità riproduttiva sono correlati.

La leptina, il prodotto del gene *ob*, è un segnale umorale secreto dal tessuto adiposo che agisce nel sistema nervoso centrale al fine di regolare l'alimentazione ed il peso corporeo (Barb, 1999).

Sembra che proprio la leptina sia l'anello di congiunzione tra funzione riproduttiva e nutrizionale. La leptina stimola la secrezione di prolattina sia in vivo che in vitro; inoltre ripristina il picco di prolattina assente negli animali cachettici ovarioisterectomizzati e trattati con estradiolo e progesterone (Kohsaka et al., 1999). Queste osservazioni suggeriscono che la concentrazione fisiologica di leptina nella circolazione periferica può agire come stimolatore della secrezione di prolattina indotta dagli steroidi o spontanea.

Ricordiamo, però, che il meccanismo attraverso cui la leptina altera la secrezione di prolattina è ancora sconosciuto.

V. CONCLUSIONI

Da quanto sopra esposto appare evidente che il controllo della secrezione di prolattina è un meccanismo estremamente complesso. A tutt'oggi, però, i principali fattori neuroendocrini che agiscono sulle cellule ipofisarie secernenti prolattina possono essere di due tipi: inibitori e facilitatori la secrezione. Tra gli inibitori il principale è rappresentato dalla dopamina; mentre tra i facilitatori, che hanno una importanza ridotta rispetto ai fattori inibitori, ci sono gli estrogeni, il TRH...

Infine, l'azione di molti fattori non è stata ancora ben chiarita anche perché in alcuni stati fisiologici, questi fattori possono avere un'azione stimolatoria, in altri casi, inibitoria la secrezione di prolattina.

4.d Variazioni nella secrezione della prolattina

Nell'uomo le concentrazioni plasmatiche di prolattina sono più alte durante il sonno e basse durante la veglia, indipendentemente dal ritmo del sonno. Al contrario nei ratti c'è una stretta correlazione tra il pattern del sonno ed i livelli di prolattina (ad esempio livelli alti di prolattina fanno aumentare i movimenti REM) (Bethea et al., 1979; Kizer et al., 1975).

Probabilmente questa relazione è legata al fatto che il tono dopaminergico di origine ipotalamica, che determina un effetto inibitorio sulla secrezione di prolattina, cambia durante le 24 ore.

Lo stimolo fisiologico, però, più conosciuto che stimola la secrezione di prolattina è quello della suzione (riflesso neuroendocrino).

Nei ratti le concentrazioni ematiche di prolattina iniziano ad aumentare 1-3 minuti dall'inizio della suzione, raggiungono un picco dopo 10 minuti, restano

su un livello costante per tutta la durata dell'allattamento e poi calano una volta terminato (Grosvenor et al., 1974).

Questi parametri sono simili in tutti i mammiferi con pochissime eccezioni. In alcune scimmie l'allattamento induce un rilascio bifasico di prolattina mentre nell'uomo, cavalle e roditori la risposta della prolattina all'allattamento è sovrapposto alla secrezione di prolattina dovuta al ritmo circadiano (Frawley et al., 1983).

Il controllo della secrezione di prolattina in seguito alla suzione è, sotto alcuni aspetti, ancora sconosciuto: sicuramente lo stimolo della suzione determina una diminuzione della dopamina rilasciata nel circolo portale. Quindi questo stimolo libera le cellule lattotrope dall'inibizione tonica. Però si è visto come la quantità di prolattina rilasciata in seguito alla suzione è molto maggiore di quella ottenuta inibendo farmacologicamente il rilascio di dopamina, quindi probabilmente la suzione determina anche la liberazione di un fattore rilasciante la prolattina (PRF).

La secrezione di prolattina è stata poi studiata durante il ciclo estrale del ratto e appare bassa e costante dalla sera dell'estro al mattino del successivo proestro, successivamente si ha un picco corrispondente a quello dell'LH ma caratterizzato da un rapido innalzamento seguito da una fase di plateau prolungata ed infine una riduzione lenta (Smith et al., 1975; Murai et al., 1989). I risultati, però, ottenuti studiando il profilo di secrezione della prolattina hanno dato risultati diversi in strutture differenti.

Nei primati è stato identificato un secondo picco di prolattina (circa metà del primo come ampiezza) durante il ciclo mestruale.

Gli alti livelli di estradiolo stimolano l'asse ipotalamo-ipofisario a rilasciare il picco proestrile di prolattina (a livello dell'area preottica dell'ipotalamo) mentre non si è riusciti a rilevare una correlazione tra il progesterone e la secrezione di prolattina in questa fase proestrile.

Il ruolo dell'ipotalamo nel controllo del picco proestrile di prolattina, poi, non è del tutto chiaro: la dopamina inibisce la secrezione di prolattina e la rimozione di questa inibizione tonica dopaminergica porta ad un aumento della prolattina ma il ruolo della dopamina in questo caso è contraddittorio, alcuni studi hanno osservato una rilevante diminuzione della dopamina in relazione al suddetto picco mentre altri non hanno rilevato variazioni nella concentrazione ematica di dopamina.

Recentemente è stato osservato, nel ratto, un'azione luteotrofica della prolattina: i ratti che non si sono accoppiati hanno una fase luteale molto breve a causa della mancanza di prolattina sufficiente per mantenere il corpo luteo. Al contrario in caso di accoppiamento si ha un innalzamento dei livelli di prolattina anche se non costante ma caratterizzato da due picchi giornalieri. La secrezione di prolattina stimolata dall'accoppiamento può iniziare ed essere mantenuta indipendentemente dagli steroidi ovarici mentre in corso di pseudogavidanza il picco di prolattina termina dopo 13 giorni a causa della mancanza di progesterone e della secrezione di estradiolo prodotto dai follicoli in sviluppo (Gorospe et al., 1981).

Le aree ipotalamiche a livello delle quali agisce lo stimolo dell'accoppiamento sono state ben descritte nel ratto: la prima via di trasduzione riguarda il nervo pelvico, presumibilmente lo stimolo dell'accoppiamento è trasportato dalle vie afferenti spinali ed arriva all'ipotalamo. Sembra che l'area preottica dell'ipotalamo contenga due popolazioni funzionali di neuroni che controllano la secrezione di prolattina. Nei ratti che non si sono accoppiati, una popolazione è tonicamente attiva ed inibisce i picchi notturni di prolattina mentre l'altra è quiescente. La stimolazione del cervice uterino data dal coito inattiva la prima ed attiva la seconda che determina picchi diurni e notturni di prolattina.

Nei mammiferi che risentono del fotoperiodismo, come il ratto, la luce è un importante regolatore della secrezione di prolattina. Alterazioni nelle fasi di luce

risultano in analoghe variazioni del picco proestrile di prolattina, di quello indotto dagli estrogeni e di quello indotto dall'accoppiamento. Quando i ratti vengono tenuti in condizioni di luce costante questi diventano aciclici (Hoffman et al., 1975).

La secrezione di prolattina, nei mammiferi stagionali, risente poi delle variazioni stagionali delle ore di luce. Nella pecora l'accorciarsi dei giorni porta ad una diminuzione della secrezione di prolattina (Kennaway et al., 1982). Negli arieti si ha un effetto analogo dopo sola una settimana di esposizione a giornate con luce ridotta. L'effetto del fotoperiodismo è mediato dalla melatonina secreta dalla ghiandola pineale. Lo stimolo luminoso è trasdotto dal nucleo soprachiasmatico oppure agisce direttamente sulla ghiandola. I giorni brevi riducono, inoltre, l'attività dell'enzima tirosinidrosilasi e il contenuto di dopamina nell'eminenza mediana. Si ricordi però che questa riduzione dell'attività dopaminergica non sembra avere un effetto diretto sulla prolattina né di mediare l'effetto soppressivo della melatonina sulla secrezione di prolattina (Viguie et al., 1997). Infine ricordiamo che sia nella pecora che nell'hamster le informazioni sul fotoperiodismo raccolte dalla madre in gravidanza influenzano la secrezione di prolattina della prole a livello postnatale (Ebling et al., 1989; Shaw et al., 1995).

Dei diversi fattori ambientali ritenuti responsabili della secrezione di prolattina, l'effetto dei richiami è uno di quelli a cui meglio risponde l'organismo ma anche uno dei meno studiati. Il suono, ad esempio, dei cuccioli affamati nei ratti in lattazione o vergini stimola la secrezione di prolattina (Terkel et al., 1979).

Infine l'olfatto gioca un ruolo importante nella secrezione della prolattina. I feromoni secreti da un maschio sconosciuto verso una femmina gravida portano ad interruzione di gravidanza nel topo (effetto Bruce) (Bruce, 1970 e 1973). Lo stimolo dei feromoni è trasportato al bulbo olfattorio accessorio dai nervi vomero nasali, che sinaptano con i dendriti primari delle cellule mitrali dei

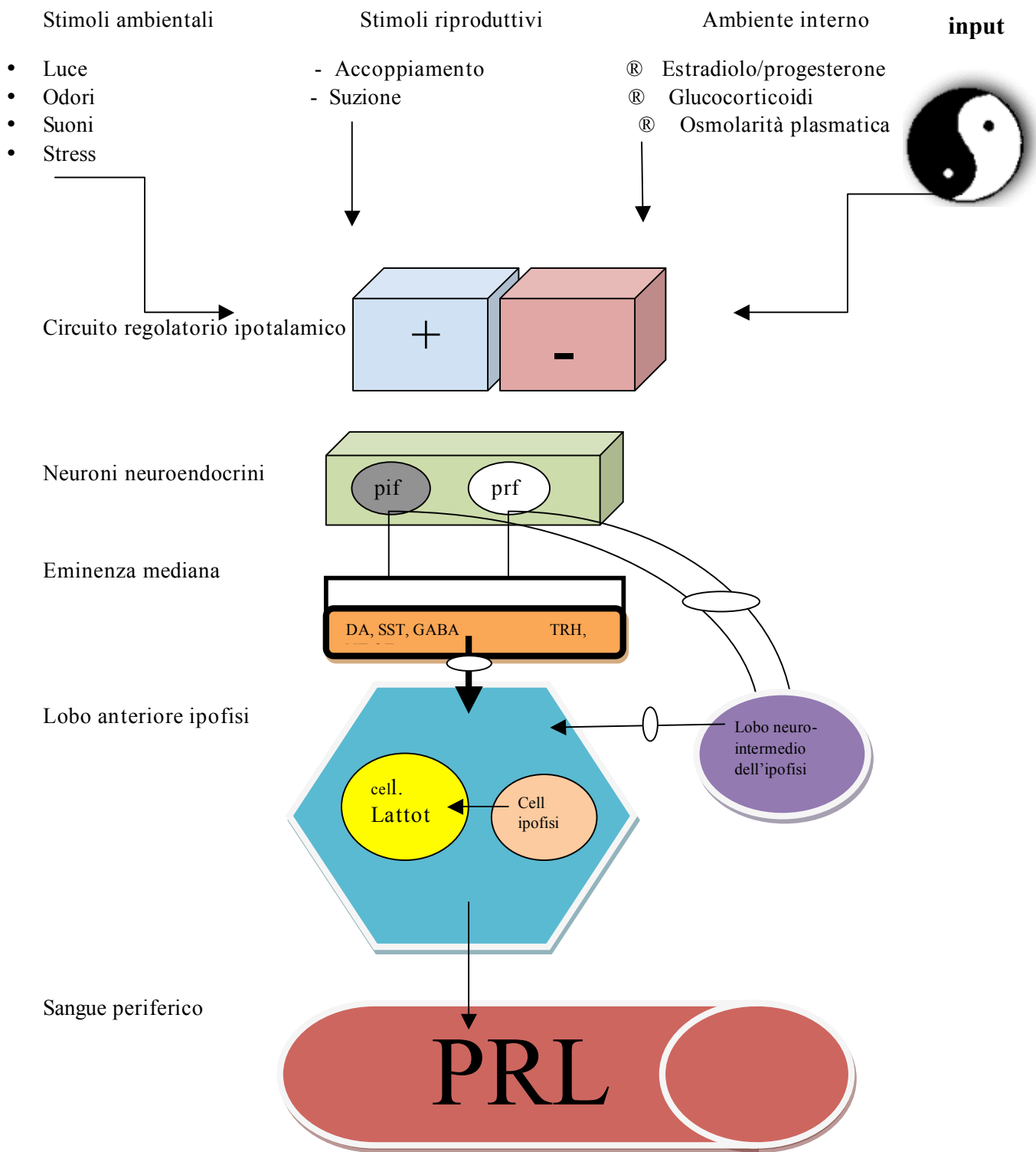
glomeruli. Le cellule mitrali eccitano le cellule corticomediali dell'amigdala che eccitano le cellule dell'area preottica mediale dell'ipotalamo. Il risultato consiste nell'eccitazione dei neuroni TIDA del nucleo arcuato. La conseguenza di ciò è una diminuzione drastica della secrezione di prolattina e del suo effetto luteotrofico. Infine si ricordi che nelle femmine in lattazione l'odore dei cuccioli determina un aumento di prolattina mentre inibisce la secrezione latte nella tarda lattazione.

Un altro elemento che può influenzare la secrezione di prolattina è lo stress.

Nella maggior parte degli studi condotti, la secrezione di prolattina aumenta o diminuisce a seconda della natura dello stress. Inoltre lo stesso stress influenza in maniera diversa la secrezione di prolattina, a seconda della fase del ciclo estrale durante il quale agisce. Ad esempio lo stress indotto dall'esposizione all'etere, nel ratto, induce un aumento della prolattina durante il diestro mentre durante il proestro ha conseguenze molto variabili (aumento, diminuzione o assenza di risposta) (Neill, 1970). Lo stress da costrizione, poi, se applicato prima del picco proestrile di prolattina intensifica lo stesso mentre, se applicato durante il picco ne causa una attenuazione.

Dato che la dopamina è il neormone ipotalamico che inibisce in maniera tonica la prolattina è ovvio pensare che questa sia implicata nelle alterazioni indotti dallo stress della secrezione di prolattina. Altre importanti sostanze di origine ipotalamica coinvolte nella regolazione della secrezione di prolattina in risposta agli stress sono: serotonina, istamina, acido N-metil-D, L-aspartico, peptide natriuretico atriale, betaendorfina e dimorfina, ossitocina e vasopressina. Infine, dato il ruolo che la prolattina ha nell'immunità umorale e cellulomediata, è ovvio pensare che la prolattina abbia un'importante azione immunomodulatrice proteggendo l'organismo dalle conseguenze dello stress (Gala, 1990). È stata anche ipotizzata un'azione gastroprotettiva della prolattina durante la lattazione nei confronti delle ulcere indotte dallo stress.

Fig. 4.II Regolazione della secrezione di prolattina (Freeman et al., 2000)



4.e Azioni biologiche della prolattina

La prolattina è ben conosciuta per i suoi effetti sulla ghiandola mammaria in cui determina crescita e sviluppo ghiandolare (mammogenesi), sintesi del latte (lattogenesi) e mantenimento della secrezione latte (galattopoiesi). È bene ricordare che altri ormoni sono coinvolti nella galattopoiesi come il GH (od ormone della crescita), l'ormone tiroideo, l'ormone paratiroideo, la calcitonina, numerosi fattori della crescita e l'ossitocina (Tucker, 1994).

Nel processo galattopoietico la prolattina stimola l'assorbimento di amminoacidi, la sintesi di proteine del latte come caseina ed α -lattoalbumina, l'assorbimento del glucosio e la sintesi dei grassi e del lattosio (Barber et al., 1992; Tucker, 1994).

L'effetto, invece, della prolattina sulla funzione luteinica dipende dalla specie e dallo stadio del ciclo estrale. Nei roditori la prolattina può avere un effetto luteotropo o luteolitico a seconda se si accoppiano o no. L'azione luteotropa (ben descritta nel ratto) induce un aumento della secrezione del progesterone importante per l'impianto dell'embrione, per il mantenimento della gravidanza e l'inibizione dell'ovulazione. La prolattina stimola l'aumento del progesterone in due modi: potenzia gli effetti steroidogenici dell'LH a livello delle cellule follicolari ed inibisce l'enzima 20α -idrossisteroidodeidrogenasi che inattiva il progesterone (Freeman, 1994).

Ricordiamo infine che il recettore della prolattina media numerose funzioni nelle cellule della granulosa e dell'oocita.

Oltre alla suddetta azione luteotrofica ci sono prove di una azione luteolitica della prolattina nel ratto, nel quale determina apoptosi del corpo luteo (effetto mediato dai linfociti CD3+) (Matsuyama et al., 1996).

Ulteriore funzione della prolattina è la sua importante influenza sul comportamento riproduttivo. Nei ratti la prolattina aumenta la recettività sessuale in animali ovarioisterectomizzati e trattati con estradiolo ma l'aumento

della prolattina endogena in risposta ad un antagonista della dopamina non sembra avere effetto sul comportamento sessuale mentre l'aumento della prolattina in risposta allo stimolo della suzione riduce tale comportamento (Sodersten et al., 1983). Al contrario, quando il ratto è sessualmente ricettivo (tardo proestro), la soppressione del rilascio spontaneo di prolattina con un agonista della dopamina attenua in maniera radicale la ricettività sessuale.

Infine ricordiamo il ruolo fondamentale rivestito dalla prolattina nel determinismo del comportamento parentale, che include la costruzione del nido, l'accudimento e l'allattamento. Alcuni studi hanno dimostrato come non sia la prolattina che fa iniziare il comportamento materno per sé ma che in realtà riduce il tempo di latenza prima dell'inizio di tale comportamento (Bridges et al., 1990). Questo ruolo della prolattina è stato verificato somministrando bromocriptina e osservando l'assenza di tale comportamento che invece si promuoveva con la superinfusione di prolattina.

La prolattina, inoltre, è un mediatore comune della rete neuroendocrina che gioca un ruolo significativo nella regolazione della risposta immunitaria umorale e cellulo-mediata sia in condizioni fisiologiche che patologiche (anche in corso di patologie di origine autoimmune).

Le prime prove del ruolo della prolattina a questo livello furono studiate da Nagy e Berczi (1978) che osservarono come la soppressione della secrezione di prolattina tramite bromocriptina porta ad una attenuazione dell'immunità umorale o cellulo-mediata. Inoltre numerose alterazioni del sistema immunitario sono state associate a deficienze di prolattina.

La prolattina agisce a livello dei linfociti T e B in cui sono stati evidenziati recettori per questo ormone (anche a livello di milza, timo, linfonodi e midollo osseo di ratti e topi).

Una delle funzioni più sconosciute della prolattina è quella rappresentata dalla regolazione del trasporto di soluti e acqua attraverso le membrane cellulari di

mammiferi: la prolattina diminuisce il trasporto di sodio ed aumenta quello del potassio attraverso le membrane cellulari; stimola l'assorbimento di amminoacidi a livello di ghiandola mammaria e determina il trasporto di acqua attraverso la membrana amniotica (Shennan, 1994).

Infine nel ratto è stato osservato che l'angiogenesi è inibita da frammenti proteolitici della prolattina naturale mentre nell'uomo la prolattina stimola l'angiogenesi insieme ad altri fattori quali l'ormone lattogeno placentare e il GH (Clapp et al., 1997).

CAP.5 EFFETTO DELLA SOMMINISTRAZIONE DI UN AGONISTA DELLA DOPAMINA SUL PROFILO ENDOCRINO IN CAGNE IN ANESTRO, PROESTRO ED ESTRO

5.a Introduzione

La cagna è un animale monoestrale stagionale caratterizzato da 2 cicli estrali all'anno costituiti da una prolungata fase follicolare ed anche luteale (75 giorni).

Dopo l'anestro i meccanismi che determinano l'inizio di una nuova fase follicolare sono ancora poco conosciuti anche se l'evento critico sembra essere un aumento delle concentrazioni plasmatiche di FSH (De Gier et al., 2006) ed un aumento delle concentrazioni basali e della pulsatilità dell'LH (Olson et al., 1982).

La dopamina e/o la prolattina sembrano rivestire un ruolo importante nell'inibizione dello sviluppo follicolare durante l'anestro. Infatti la somministrazione di agonisti della dopamina a cagne in anestro determina una riduzione delle concentrazioni plasmatiche di prolattina ed induce attività follicolare ed infine estro (Verstegen et al., 1999).

Inizialmente è stato ipotizzato che l'inibizione della secrezione di prolattina sia un prerequisito fondamentale per l'induzione dell'estro. Però successivamente è stato osservato che la sola inibizione della secrezione di prolattina non è sufficiente a ridurre la durata della fase anestrata. Questo è stato dimostrato trattando le cagne con metergolina a basse ed alte dosi. Nel primo caso (azione sui recettori della serotonina) si otteneva una riduzione della prolattinemia ma senza indurre estro mentre utilizzata ad alte dosi si otteneva estro. Queste osservazioni indicano, quindi, che l'induzione della follicologenesi non è iniziata esclusivamente dalla prolattina. Si è ipotizzato che la somministrazione

di agonisti della dopamina è in grado di determinare l'inizio dell'estro grazie ad un aumento della secrezione di FSH e/o sensibilizzazione dell'ovaio nei confronti di FSH e LH.

I recettori dopaminergici sono presenti sia a livello ipofisario che a livello ovarico in diverse specie (tipo D1 e D2 nella giumenta, King et al., 2005) ma non sono presenti dati riguardo alla specie canina anche se l'azione positiva della bromocriptina (agonista dei recettori D2) sulla secrezione di FSH e sulla follicologenesi in cagne in anestro suggerisce la presenza di recettori di tipo D2 nell'ovaio canino, almeno in questa fase del ciclo estrale.

Paragonata alla bromocriptina, la cabergolina, dotata anch'essa di attività dopaminosimile, è caratterizzata da una affinità per il recettore dopaminico D2 superiore e da una inferiore attività per i recettori 5HT2 per la serotonina, oltre che da una maggiore durata d'azione (Rains et al., 1995; Di Salle et al., 1983). La cabergolina, inoltre, è dotata di minori effetti collaterali sul sistema nervoso centrale rispetto alla bromocriptina. Al dosaggio usato per il trattamento della pseudogavidanza (5 µg/Kg/die) la cabergolina può indurre effetti collaterali, quali nausea e vomito, ma minori rispetto alla bromocriptina.

La ricerca è stata fatta mediante due studi: il primo si è basato sulla somministrazione di un agonista della dopamina, la cabergolina, a cagne in anestro per 4 settimane o fino al proestro al fine di ridurre il periodo interestrale. Sono stati quindi approfonditi gli aspetti endocrinologici (profili ematici di LH e prolattina) responsabili del termine dell'anestro e dell'inizio di un nuovo ciclo estrale.

Il secondo studio consisteva nella somministrazione di cabergolina a cagne in proestro ed estro per 20 giorni a partire dal primo giorno di proestro al fine di indagare eventuali alterazioni ormonali (LH, prolattina e progesterone) e le loro conseguenze sul ciclo estrale.

5.b Esperimento 1: effetto della somministrazione di cabergolina sulla ripresa dell'attività riproduttiva nella cagna in anestro.

Lo scopo di questo lavoro era comprendere il meccanismo attraverso il quale gli agonisti della dopamina, come la cabergolina, sono in grado di ridurre l'intervallo interestrile quando somministrati a cagne in piena fase anestrile. Quello che ci proponevamo era comprendere, in particolare, il ruolo della prolattina e dell' LH nell'inizio di un nuovo ciclo estrale.

I. MATERIALI E METODI

Lo studio è stato effettuato su un gruppo di 13 cagne di razza Beagle (10 trattate e 3 di controllo) di età compresa tra i 3 e i 6 anni ed un gruppo di cagne di razza Greyhound (6 trattate e 4 di controllo) di età compresa tra i 4 e i 6 anni. I Beagle si trovavano a Budapest (Ungheria) mentre i Greyhound a Parma (Italia). Gli animali avevano la possibilità di passeggiate all'esterno e la disponibilità di ricoveri chiusi per riposare. L'alimentazione è stata di tipo commerciale e somministrata 2 volte al giorno con accesso ad libitum all'acqua.

Erano disponibili i dati relativi all'attività riproduttiva degli animali nei due anni precedenti lo studio e nessun animale aveva manifestato disturbi riguardanti la sfera riproduttiva.

L'inizio del proestro è stato fatto coincidere con la presenza di scolo sieromorragico a livello vulvare (i controlli venivano eseguiti 2 volte al giorno). L'estro coincideva con la prima accettazione all'accoppiamento da parte della femmina.

Agli animali trattati è stata somministrata cabergolina (agonista della dopamina) alla dose di 5 µg/Kg/die a partire dal 90°-100° giorno dalla fine dell'estro per 4 settimane o fino alla comparsa del proestro. Le concentrazioni plasmatiche di ormone luteinizzante (LH) e prolattina (PRL) sono state valutate a partire da campioni di sangue prelevato dalla vena safena e conservato in litio eparina.

Prelievi singoli sono stati eseguiti ogni 7 giorni nelle tre settimane precedenti l'inizio del trattamento con cabergolina e prelievi multipli con frequenza di prelievo ogni 15 minuti per 6 ore consecutive settimanalmente per tutta la durata del trattamento. Il plasma è stato separato per centrifugazione e conservato alla temperatura di -20°C. L'ormone luteinizzante è stato valutato su ciascun campione mentre la prolattina su campioni ottenuti in prelievi eseguiti nell'arco di 30 minuti.

Tutte le cagne sono state sottoposte ad esame ecografico con Aloka 500 SD con sonda lineare e settoriale da 7.5 MHz 3 volte alla settimana prima del trattamento e quotidianamente durante il trattamento. Le concentrazioni plasmatiche di prolattina sono state determinate tramite dosaggio radioimmunoenzimatico omologo a doppio anticorpo. La sensibilità media di questo dosaggio era 0.68 ng/ml e i coefficienti di variazione tra i diversi dosaggi e all'interno dello stesso campione per concentrazioni di 0.39 e 12.5 ng/ml erano rispettivamente 4.5 e 3.5%.

Le concentrazioni plasmatiche di LH sono state determinate utilizzando un sistema di dosaggio radioimmunoenzimatico a doppio anticorpo omologo sviluppato per la pecora ed adattato alla specie canina utilizzando un reagente omologo fornito dal Dr. AF Farlow (NHPP-NIDDK). Il sistema utilizza un antisiero di coniglio attivo contro l'LH canino ad una diluizione finale di 1:60.000 e LH marcato con isotopo ¹²⁵I. La sensibilità media di questo metodo era di 0.10 ng/ml. I coefficienti di variazione tra i vari campioni e all'interno dello stesso campione per concentrazioni tra 0.25 e 2.5 ng/ml erano di 11.2 e 2.0% rispettivamente.

I dati ottenuti sono stati analizzati mediante metodi statistici suddividendo il tempo di campionamento in 5 periodi: uno precedente il trattamento (periodo 1), due dopo il trattamento ma prima del proestro (periodi 2 e 3) e due dopo l'inizio del proestro (periodi 4 e 5).

I dati riguardanti l'intervallo tra l'inizio del trattamento ed il proestro e la durata del proestro e l'estro per le concentrazioni medie di LH e PRL sono stati analizzati mediante procedura General Linear Model del programma SPSS per la versione di Windows 10.0. Non sono stati inclusi nel modello finale gli effetti legati all'operatore ecografico, alla razza e al luogo in cui si trovavano gli animali poiché non erano risultati significativi.

II. RISULTATI

Negli animali trattati il proestro è stato rilevato in 8/10 Beagle (80%) ($P=0.017$) e in 3 Greyhound su 6 (50%) ($P=0.177$). Nessun animale controllo ha manifestato proestro durante l'esperimento o entro 130 giorni dall'ultimo estro.

L'intervallo interestrato medio negli animali trattati è stato rispettivamente di 132 ± 5.0 e 169 ± 7.0 (media \pm S.E.M.) giorni per i Beagle e i Greyhound. Questi valori differiscono significativamente da quelli ottenuti sia nel ciclo precedente il trattamento (192 ± 0.90 e 198 ± 12.0 giorni) sia rispetto al ciclo del gruppo controllo (194 ± 11.0 e 196 ± 11.0 giorni) rispettivamente per i Beagle ed i Greyhound ($P<0.001$).

Negli animali trattati è stato osservato un aumento significativo ($P<0.05$) della durata del proestro (10.6 ± 0.50 e 11.7 ± 0.50 giorni nel ciclo del trattamento rispetto a 8.4 ± 0.30 e 8.8 ± 0.40 giorni del ciclo precedente il trattamento rispettivamente nei Beagle e nei Greyhound) ma non della fase estrale (8.9 ± 0.90 giorni e 8.6 ± 0.40 giorni del ciclo del trattamento rispetto a 8.6 ± 0.40 giorni e 8.4 ± 0.80 giorni del ciclo precedente il trattamento rispettivamente per i Beagle ed i Greyhound).

Negli animali trattati, infine, le concentrazioni medie di LH durante i periodi immediatamente antecedenti e successivi il proestro sono risultate più elevate ($P<0.001$) rispetto ai periodi precedenti. Negli animali controllo, invece, le

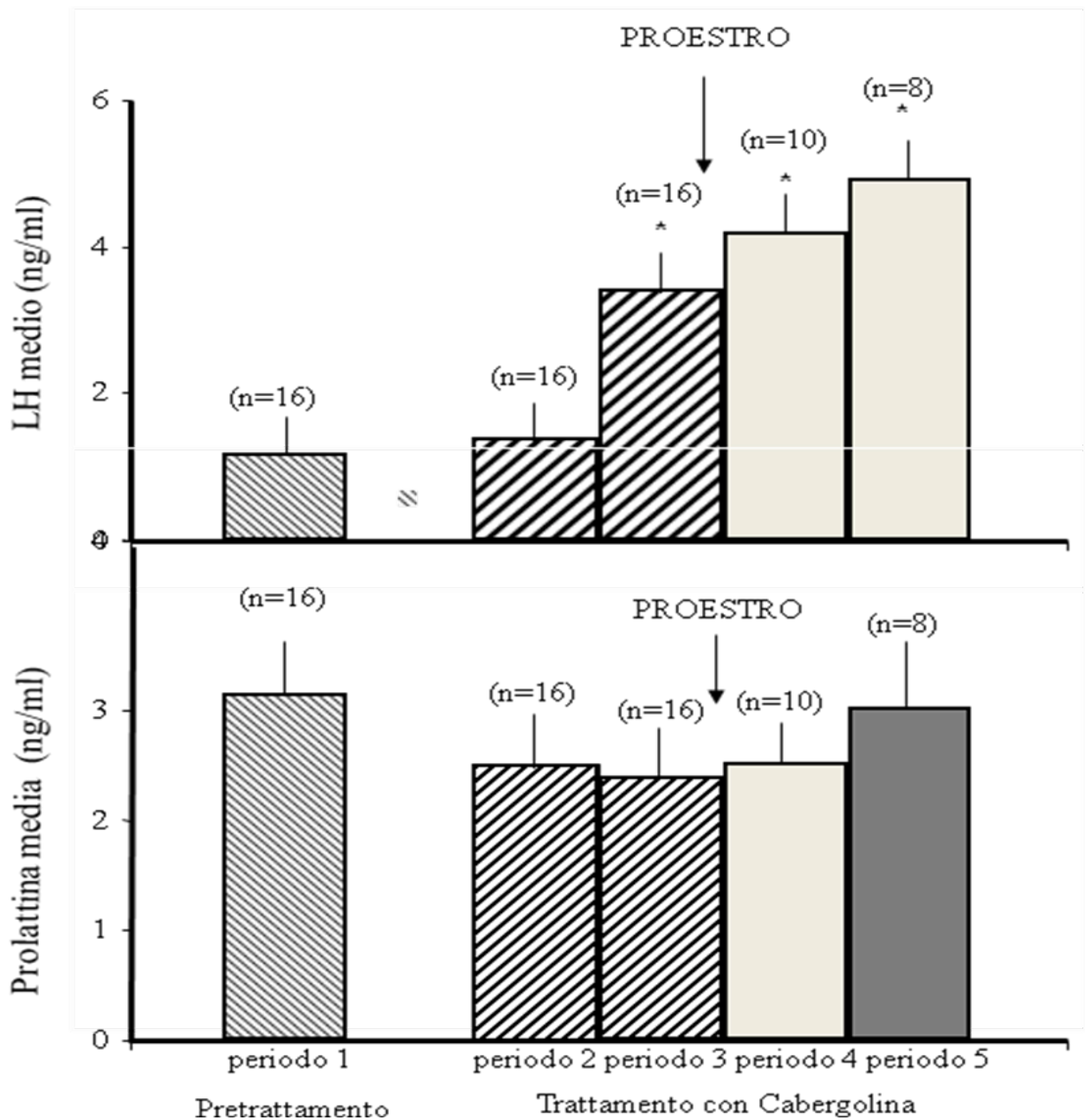
concentrazioni medie di LH erano basse e praticamente invariate nei diversi periodi.

Le concentrazioni di prolattina hanno presentato un'alta variabilità nei diversi animali con una tendenza, anche se non statisticamente significativa, a essere più basse negli animali trattati.

Tab. 5.I Numero delle cagne (Beagle e Greyhound) che hanno risposto al trattamento, periodo interestrile (giorni), periodo dall'inizio del trattamento al proestro (giorni), durata del proestro (giorni) e durata dell'estro (giorni) negli animali trattati ed in quelli di controllo.

	Beagle		Greyhound	
	Controllo	Trattati	Controllo	Trattati
Estro	0/3	8/10	0/4	3/6
<i>Intervallo interestrile</i>				
Ciclo precedente	192±10	192±10	192±10	198±12
Ciclo esperimento	194±11	132±5.0	196±11	169±7.0
Intervallo trattamento-proestro		13.3±1.9		21.3±1.7
<i>Durata del proestro</i>				
Ciclo precedente	8.5±0.6	8.4±0.3	8.7±0.6	8.8±0.4
Ciclo esperimento	9.6±0.5	10.6±0.5	9.2±0.5	11.7±0.5
<i>Durata dell'estro</i>				
Ciclo precedente	8.7±0.4	8.6±0.4	8.7±0.4	8.4±0.8
Ciclo esperimento	8.9±0.9	8.9±0.9	8.0±0.9	8.6±4

Fig. 5.I Concentrazioni ematiche medie di LH e prolattina in cagne di razza Beagle e Greyhound prima del trattamento (periodo 1) e trattati con Cabergolina (periodi 2,3,4 e 5) che hanno manifestato il proestro (*P<0.001). I livelli medi di LH tendono ad aumentare subito prima e dopo il proestro mentre quelli di prolattina si mantengono inalterati.



III. DISCUSSIONE

Nella specie canina è possibile ridurre l'intervallo interestrato con somministrazioni frequenti di GnRH (Kutzler et al., 2001), somministrazioni di gonadotropine (Vertsetgen et al., 1997) o agonisti della dopamina (Okkens et al., 1985).

I risultati di questo studio confermano che la somministrazione di agonisti della dopamina, come la cabergolina, in cagne in anestro è in grado di indurre l'estro. La durata del proestro è risultata aumentata in tutti gli animali trattati sia rispetto al gruppo di controllo che rispetto al ciclo precedente il trattamento. In particolare i Greyhound hanno manifestato una maggiore durata del proestro rispetto ai Beagle. Dato che non sono state osservate differenze significative tra le due razze nelle concentrazioni di LH e prolattina si può ipotizzare che questo fenomeno sia legato a differenti concentrazioni di FSH in quanto la posologia del farmaco era la stessa nei due gruppi.

I livelli plasmatici di prolattina durante il trattamento non sono diminuiti, forse perché erano già bassi dall'inizio o forse a causa delle variazioni individuali non è stato possibile rilevare questa soppressione. Questa ampia variabilità delle concentrazioni ematiche di prolattina è già stata descritta in letteratura (Corrada et al., 2006; Rota et al., 2003).

Diversi studi hanno indagato l'efficacia degli agonisti della dopamina nel determinare una diminuzione delle concentrazioni plasmatiche di prolattina: basse dosi di bromocriptina riducono il periodo interestrato senza una parallela riduzione della prolattinemia. Altri studi (Onclin et al., 1995; Jochle et al., 1989) dimostrano come gli agonisti della dopamina determinano una riduzione dei livelli plasmatici di prolattina. Queste differenze sono, probabilmente, legate al diverso tipo di agonista o al protocollo utilizzato. Tutti questi dati (compreso il nostro studio) comunque confermano che la prolattina per sé non ha un ruolo fondamentale nella follicologenesi canina.

I livelli sierici di LH sono aumentati prima dell'inizio del proestro ad indicare una inibizione meno intensa sulla secrezione di LH verso la fine dell'anestro. Anche se il meccanismo che controlla la secrezione di LH durante l'anestro è ancora sconosciuta, il fatto che la cabergolina riduca l'intervallo interestrile suggerisce un ruolo del sistema dopaminergico. Infatti l'aumento delle concentrazioni plasmatiche di LH poco prima del proestro da noi osservato e osservazioni condotte in precedenza (Kooistra et al., 1999) indicano che il trattamento con gli agonisti della dopamina stimola la secrezione di LH e, probabilmente, riduce l'effetto di fattori inibitori non ancora identificati. L'aumento dell'LH sembra rappresentare il prerequisito fondamentale per il termine della fase anestrile, infatti, basti notare che la somministrazione di GnRH e LH è in grado di indurre l'estro (Inaba et al., 2005).

L'induzione dello sviluppo follicolare non è innescato dalla secrezione di prolattina ma, probabilmente, da altri effetti diretti od indiretti a livello di asse ipotalamo-ipofisi-ovaio (Olson et al., 1982).

Concludendo possiamo affermare che la somministrazione di cabergolina in cagne in anestro determina un aumento dei livelli plasmatici di LH poco prima del proestro in un'alta percentuale di animali trattati e che la prolattina per sé non sembra rivestire un ruolo fondamentale nel controllo della follicologenesi canina durante il periodo di transizione tra anestro e proestro.

5.c Esperimento 2: risposta di LH, progesterone e prolattina alla somministrazione di cabergolina in cagne trattate in proestro ed estro.

I. MATERIALI E METODI

Lo studio è stato effettuato su un gruppo di 12 cagne di razza Greyhound (6 trattate e 6 di controllo). Gli animali avevano la possibilità di passeggiate all'esterno e la disponibilità di ricoveri chiusi per riposare. L'alimentazione è stata di tipo commerciale e somministrata 2 volte al giorno con accesso ad libitum all'acqua.

I dati riguardanti l'attività riproduttiva degli animali nei tre anni precedenti lo studio erano disponibili e nessun animale aveva manifestato disturbi riguardanti la sfera riproduttiva.

L'inizio del proestro è stato fatto coincidere con scolo sieroso-emorragico a livello vulvare mentre l'inizio dell'estro con l'accettazione del maschio da parte della femmina. La fine dell'estro coincideva con il primo rifiuto della femmina.

Agli animali trattati è stata somministrata cabergolina alla dose di 5 µg/Kg al mattino per 20 giorni consecutivi a partire dal primo giorno del proestro. Nessun animale ha mostrato effetti collaterali riconducibili alla somministrazione del farmaco quali vomito e nausea.

È stato eseguito un esame ecografico delle ovaie quotidianamente durante il proestro e due volte al giorno durante la fase estrale mediante un Aloka 500 SD con sonda lineare da 7.5 MHz.

Sono stati, poi, eseguiti prelievi venosi quotidianamente durante il proestro e due volte al giorno durante l'estro. Su ciascun campione sono stati misurati i livelli di LH, prolattina e progesterone con metodo radioimmunoenzimatico.

Le concentrazioni plasmatiche di prolattina e LH sono state valutate con la stessa metodica dell'esperimento precedente mentre le concentrazioni plasmatiche di progesterone sono state determinate con un metodo destrano-

carbone radioimmunoenzimatico che utilizza antisieri anti-progesterone di coniglio alla diluizione finale di 1:15.000 con progesterone marcato con l'isotopo ^3H .

La sensibilità media di questo metodo è di 0.1 ng/ml. Il coefficiente di variazione media tra diversi campioni e all'interno dello stesso è di 3.8% e 1.7% rispettivamente.

Le concentrazioni plasmatiche di LH, progesterone e prolattina sono state analizzate statisticamente tramite procedura GLM del programma statistico SPSS per la versione di Windows 10.0. I risultati ecografici sono stati, invece, analizzati tramite test del chi quadro.

II. RISULTATI

Tutti gli animali hanno manifestato un proestro ed estro non differenti da quelli osservati nei 3 anni precedenti lo studio. Negli animali trattati la lunghezza dell'estro e del proestro non sono stati influenzati dalla somministrazione di cabergolina.

Il picco pre-ovulatorio di LH è stato identificato in 5/6 cagne trattate ed in tutti gli animali controllo e non erano presenti differenze significative nelle concentrazioni plasmatiche di questo ormone tra i due gruppi.

I livelli plasmatici di prolattina erano lievemente ridotti negli animali trattati ma questa differenza non era statisticamente significativa ($P=0.12$).

I livelli plasmatici di progesterone erano inferiori a 1.0 ng/ml prima del picco di LH e poi aumentavano gradualmente fino ad un valore medio di 4.66 ± 0.56 ng/ml al terzo giorno e 12.0 ± 0.77 ng/ml al sesto giorno dopo il picco di LH e non erano evidenziabili differenze statisticamente significative tra il gruppo controllo e quello delle cagne trattate.

III. DISCUSSIONE

Il nostro studio ci ha permesso di valutare i livelli plasmatici di progesterone, LH e prolattina ma non di FSH.

Nonostante non sia stato possibile sviluppare un metodo per la misurazione dell'FSH canino il fatto che non si siano rilevate differenze ecografiche nell'accrescimento follicolare tra gli animali trattati ed il gruppo controllo fa supporre che la cabergolina non influenzi la secrezione di FSH durante il ciclo estrale della cagna.

Nella cagna i livelli di progesterone sono utili per determinare l'ovulazione (Hase et al., 2000) e questo è stato confermato dal nostro studio, infatti grazie alla misurazione del progesterone è stato possibile confermare che in tutti gli animali l'ovulazione è avvenuta entro 3 giorni dal picco di LH.

I livelli di LH osservati nello studio erano simili negli animali trattati ed in quelli di controllo come riportato in studi precedenti (Hase et al., 2000; Concannon et al., 1993) e il mancato effetto della cabergolina suggerisce che la dopamina, nelle cagne in estro, non influenza il picco preovulatorio di LH.

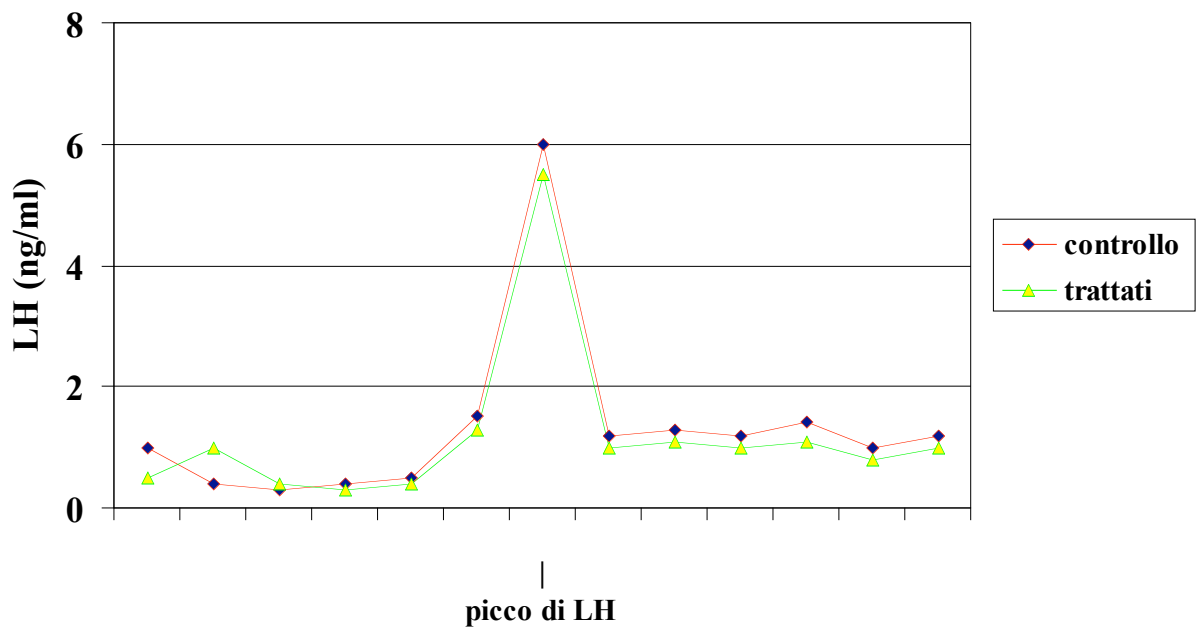
Nel nostro studio, la concentrazione media di prolattina era bassa negli animali controllo e non subiva variazioni durante la fase follicolare o nella prima parte della fase luteinica. Il trattamento con cabergolina non ha modificato il profilo della prolattina negli animali trattati probabilmente perché i livelli di questo ormone erano già bassi all'inizio del trattamento. Questo differisce da quanto succede nel caso in cui la cabergolina venga somministrata in anestro dove si verifica, solitamente, un calo della prolattinemia. Da questo si evince che il controllo delle concentrazioni plasmatiche di prolattina differisce a seconda dello stato riproduttivo e che la prolattina *per sé* non riveste un ruolo fondamentale nel controllo della follicologenesi e dell'ovulazione canina.

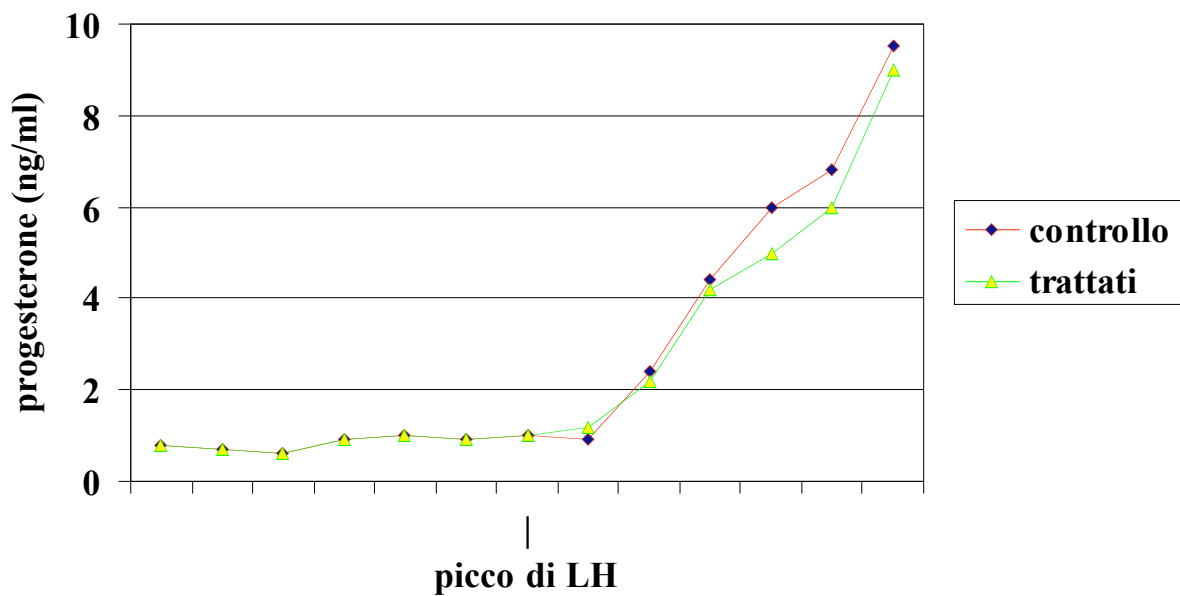
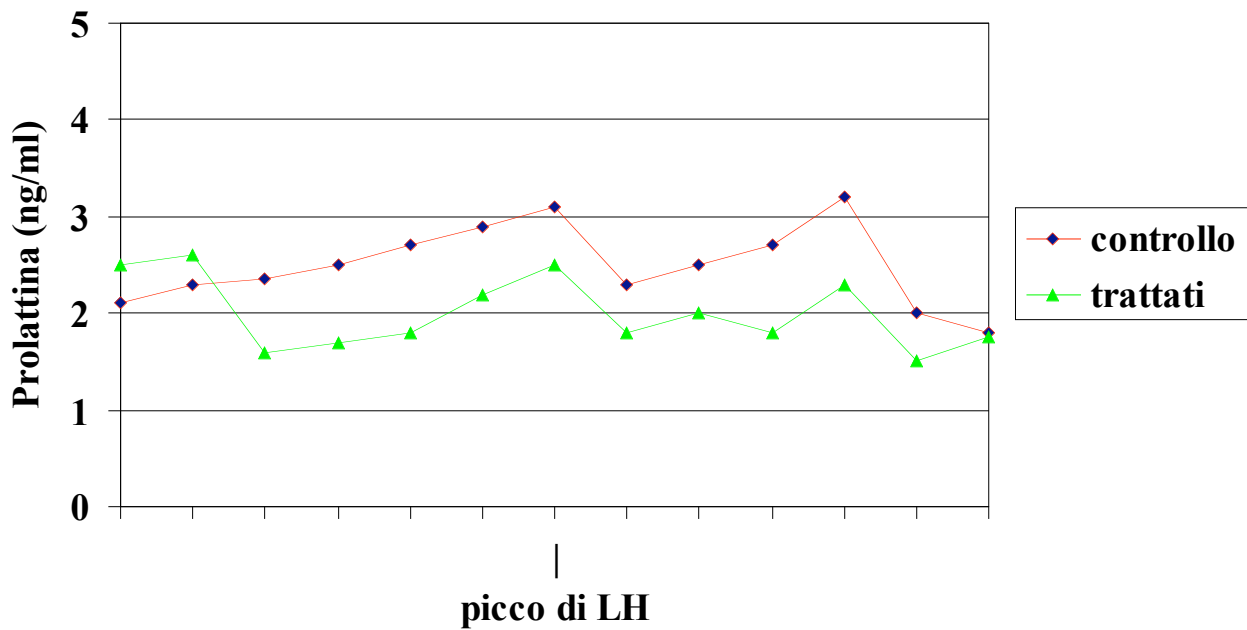
Gli agonisti della dopamina sono usati nelle cagne in anestro per ridurre l'intervallo interestrile ma non è mai stato indagato se il trattamento dovesse

essere protratto durante il proestro o se questo avesse degli effetti negativi sullo sviluppo follicolare o sull'ovulazione. Il nostro studio suggerisce che la somministrazione di cabergolina durante il proestro ed estro non interferisce con lo sviluppo follicolare.

Concludendo possiamo affermare che la somministrazione di cabergolina a cagne in proestro ed estro non modifica lo sviluppo follicolare o quello luteinico.

Fig. 5.II Concentrazioni plasmatiche medie di progesterone, LH e prolattina in cagne trattate con Cabergolina (5 µg/Kg/die) per 20 giorni a partire dal primo giorno di proestro.





CAP. 6 ESPERIMENTO 3: STUDIO CLINICO DELLE CISTI OVARICHE NELLA GATTA

6.a Introduzione

Le cisti ovariche sono una patologia molto frequente negli animali domestici che è stata ben descritta nella bovina, cavalla e cagna ma non ci sono dati riguardanti la specie felina.

Con il termine di cisti ovarica, generalmente, si intende una struttura presente a livello ovarico di dimensioni maggiori a quelle di un follicolo preovulatorio, persistente, che può produrre o meno ormoni e che in certi casi può regredire spontaneamente.

Nel cane le cisti ovariche, solitamente, appaiono come strutture rotondeggianti, con margini regolari, parete sottile, tendenzialmente anecogene, ma a volte finemente ecogene per la presenza di fluido particolato. L'unico elemento di distinzione dalle strutture fisiologiche può essere la misura del diametro, in quanto raramente i follicoli preovulatori od i corpi lutei hanno dimensioni che superano il centimetro (Bargellini et al, 2006).

Le cisti ovariche sono di diversi tipi. Le cisti follicolari sono le più frequenti (comuni nella specie bovina, suina e canina) e derivano da follicoli di Graaf che permangono in assenza di ovulazione. Possono essere singole o multiple ed interessare una od entrambe le ovaie. Si sviluppano nei casi in cui il rilascio di GnRH e quindi di LH sia insufficiente a determinare l'ovulazione (Marcato, 2002).

Le cisti luteiniche, solitamente, derivano da una cisti follicolare che con il tempo si luteinizza. Le cisti luteiniche possono produrre, quindi, progesterone per lungo tempo, impedendo lo sviluppo follicolare ed il calore (Marcato, 2002). La cisti luteinica ha dimensioni maggiori di un corpo luteo normale ed una forma

più rotondeggiante. Questo reperto è frequente nella bovina, nella pecora e nella scrofa ma si rileva solo occasionalmente nella cagna.

Più frequentemente, nella gatta, si riscontrano le cisti della rete ovarii. Queste strutture, osservabili con esame istologico, sono costituite da cordoni cellulari e tubuli irregolari situati nella midollare dell'ovaio e sono particolarmente sviluppate in corrispondenza dell'ilo (Gelberg et al., 1984). L'identificazione di questo tipo di strutture non è sempre agevole. Nella specie felina la loro genesi sembra essere legata al fatto che il secreto delle cellule dei tubuli della rete non riesce ad essere drenato (Marcato, 2002).

Lo scopo di questo lavoro è stato quello di studiare mediante esame ecografico ed ormonale l'evoluzione di una cisti ovarica nella gatta.

Il seguente studio è stato condotto su una femmina di Maine Coon, razza felina notevolmente in espansione in Italia negli ultimi anni. L'importanza di poter utilizzare una gatta di razza Maine Coon per lo studio delle cisti ovariche è che questa è una delle razze di gatti dalle dimensioni maggiori con le femmine che possono raggiungere addirittura i 7-9 Kg e sono quindi ottimi modelli per lo studio ecografico dell'ovaio.

6.b Segnalamento ed analisi ormonali

L'oggetto dello studio è una gatta di razza Maine Coon, nata il 16/05/2006, nome Tanita, colore brown tortie mackerel and white, di 4.7 kg di peso.

La gatta è allevata in un ambiente domestico ed è nutrita solo con alimentazione commerciale.

Il dosaggio del progesterone sierico è stato effettuato mediante metodica di chemiluminescenza presso il laboratorio di analisi San Marco (Padova).

L'esame ecografico è stato eseguito mediante ecografo MyLab 30 (Esaote) dotato di sonda lineare e settoriale.

6.c Motivo della visita e piano diagnostico

Tanita è stata condotta presso la clinica veterinaria il 09/08/2007 per eseguire una diagnosi di gravidanza mediante esame ecografico in quanto era stata fatta accoppiare 30 giorni prima e, secondo la proprietaria, manifestava i comportamenti tipici della gravidanza quali maggiore affettuosità e tendenza a farsi il nido.

Per effettuare l'esame ecografico dell'ovaio sinistro l'animale, dopo accurata tricotomia, è stato posto in decubito laterale destro ed è stata eseguita una scansione longitudinale laterale sinistra, seguita l'aorta in direzione craniale, individuato il polo vascolare ed il polo caudale del rene sinistro, quindi è stata cercata una scansione più laterale o mediale, diminuendo la pressione e portando il trasduttore appena caudalmente rispetto al polo renale.

Per il reperimento dell'ovaio destro la gatta è stata posta in decubito laterale sinistro col dorso rivolto all'operatore. La struttura è stata visualizzata prendendo come riferimento i vasi ed il rene destro, quindi portando la sonda appena caudalmente seguendo a ritroso la vena cava e, diminuendo la pressione e cercando una scansione poco più mediale.

L'esame ultrasonografico rilevava, a livello di ovaio sinistro, una struttura ipoecogena con debole rinforzo acustico posteriore con diametro minore di 3.5 mm e diametro maggiore di 4.2 mm. Il resto del parenchima era nella norma. Le dimensioni dell'ovaio destro risultavano nei limiti della norma (Fig.6. I, II, III).

Essendo l'ovulazione avvenuta circa 30 giorni prima le dimensioni di questa struttura ci hanno fatto supporre che si trattasse di una cisti, molto probabilmente di natura luteinica. Infatti, solitamente, il corpo luteo fisiologico raggiunge una dimensione massima di 5 mm nei primi cinque giorni di diestro e poi regredisce in caso di mancata gravidanza, nell'arco di 35-40 giorni (Tsutsui et al., 1993; Günzel-Abe et al., 1998).

Dopo 40 giorni la proprietaria ha evidenziato segni di estro: emissione di un miagolio simile al pianto e accucciamento con la regione pelvica alzata ed un movimento delle zampe ritmico (risposta lordotica). Venti giorni dopo questo calore presunto (10/10/2007) è stato eseguito un esame ecografico e dosaggio del progesterone sierico. L'ovaio sinistro presentava una struttura ipoecogena con debole rinforzo acustico posteriore con diametro minore di 2.5 mm e diametro maggiore di 3.0 mm (Fig. 6.IV). Inoltre erano presenti altre formazioni ipoecogene compatibili con follicoli in regressione o corpi lutei in formazione. L'ovaio destro presentava strutture ipoecogene simili a quelle presenti nell'ovaio sinistro (Fig. 6.V). La concentrazione di progesterone sierico era di 9.94 ng/ml. Dopo 15 giorni sono stati ripetuti sia l'indagine ecografica che il dosaggio del progesterone sierico. La struttura ecografica presente nell'ovaio sinistro si mostrava in regressione sia anatomicamente (rinforzo di parete praticamente assente) che funzionalmente (progesterone sierico inferiore ad 1 ng/ml). Non erano presenti altre strutture sia a livello di ovaio sinistro che destro.

La gatta non ha manifestato altri calori, probabilmente a causa dell'instaurarsi dell'anestro stagionale. Un controllo ecografico eseguito il 25/11/2007 non rilevava alcuna attività ovarica.

Con l'inizio della stagione riproduttiva successiva Tanita ha manifestato un calore normale, è stata fatta accoppiare ed il 17/05/2008 ha partorito 5 cuccioli.

6. d Discussione

Questo studio ci ha permesso di monitorare una cisti ovarica nella gatta. Questa patologia non è stata molto studiata nella specie felina ed in bibliografia non si trovano dati a riguardo. Probabilmente per difficoltà nel diagnosticarla dato che l'esame ecografico dell'ovaio della gatta è molto difficile. In questo studio, grazie alla qualità dell'apparecchiatura ecografica, esperienza dell'operatore e,

soprattutto, dimensioni dell'animale è stato possibile reperire l'ovaio ed analizzarlo ripetutamente.

La struttura a livello ovarico da noi osservata, date le sue caratteristiche ecografiche ed i livelli ematici di progesterone, è probabilmente una cisti luteinica parzialmente funzionale o non funzionale. Infatti la presenza di una cisti luteinica pienamente funzionale porta ad una secrezione di progesterone tale da causare una inibizione del ciclo estrale. Questo non si è verificato nel nostro caso, infatti 40 giorni dopo il rilevamento ecografico della struttura cistica la proprietaria ha riportato un presunto calore che è stato poi confermato dalla presenza di strutture ecografiche ipoecogene (corpi lutei) ed alti tassi di progesterone sierico (9 ng/ml).

La struttura cistica è poi regredita spontaneamente in maniera del tutto analoga a quanto può avvenire nella specie canina e bovina. Nella bovina i tassi d'incidenza delle cisti ovariche variano dal 6 al 19%. Nel primo periodo post-partum, però, l'incidenza è superiore ma circa il 60% delle bovine che sviluppano questa patologia ristabiliscono spontaneamente il ciclo ovarico entro 60 giorni dal parto (Ijaz et al., 1987).

Dopo la prima indagine ecografica, Tanita, non è più stata accoppiata, ma nonostante questo ha mostrato segni di calore, verificato dal dosaggio del progesterone e dall'esame ultrasonografico. Questo fenomeno, ovvero l'ovulazione spontanea nella specie felina, è un dato raramente riportato in letteratura. La gatta è definita come un animale poliestrile stagionale ad ovulazione indotta. È stato però osservato che è possibile anche l'ovulazione spontanea (35% dei casi) (Lawler et al., 1993). La presenza dell'ovulazione senza stimolazione cervicale è stata descritta nel 1897 e successivamente è stata ipotizzata la possibilità dell'ovulazione senza accoppiamento nella specie felina studiando la piometra in questa specie (Greulich, 1934; Dow, 1962). Dow (1962) riporta che più della metà delle gatte che presentano il complesso

iperplasia cistica-piometra mostra prove istologiche di corpi lutei anche se nella maggior parte dei soggetti è altamente improbabile un accoppiamento recente. Concludendo, in questo studio è stato possibile identificare e monitorare una cisti ovarica nella specie felina ed osservare, come può avvenire anche nel cane e nella bovina, la sua regressione spontanea. Infine abbiamo confermato i dati riportati in letteratura che descrivono la possibilità di ovulazioni spontanee anche nella gatta.

Fig. 6.I Immagine ultrasonografica dell'ovaio sinistro (09/08/2007, delimitato da frecce tratteggiate) ottenuta tramite sonda lineare (12 MHz): è ben visibile una struttura ipoecogena con rinforzo posteriore di parete (freccia continua), probabilmente una cisti luteinica.

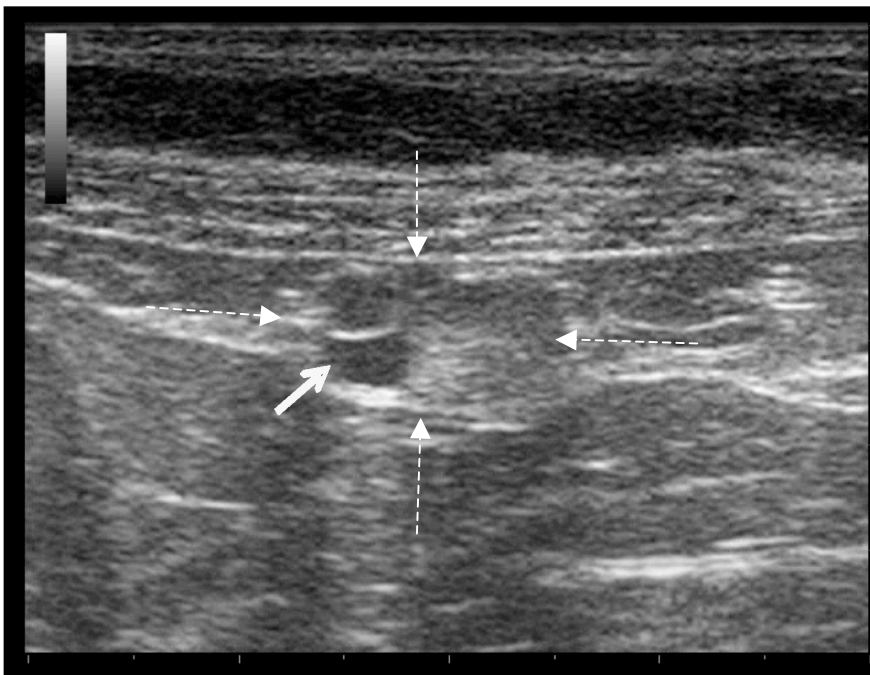


Fig. 6.II Immagine ecografica dell'ovaio sinistro (09/08/2007, delimitato da frecce tratteggiate) ottenuta con sonda lineare con evidenziazione e misurazione (3.5 mm per 4.2 mm) della struttura ipoecogena precedente.

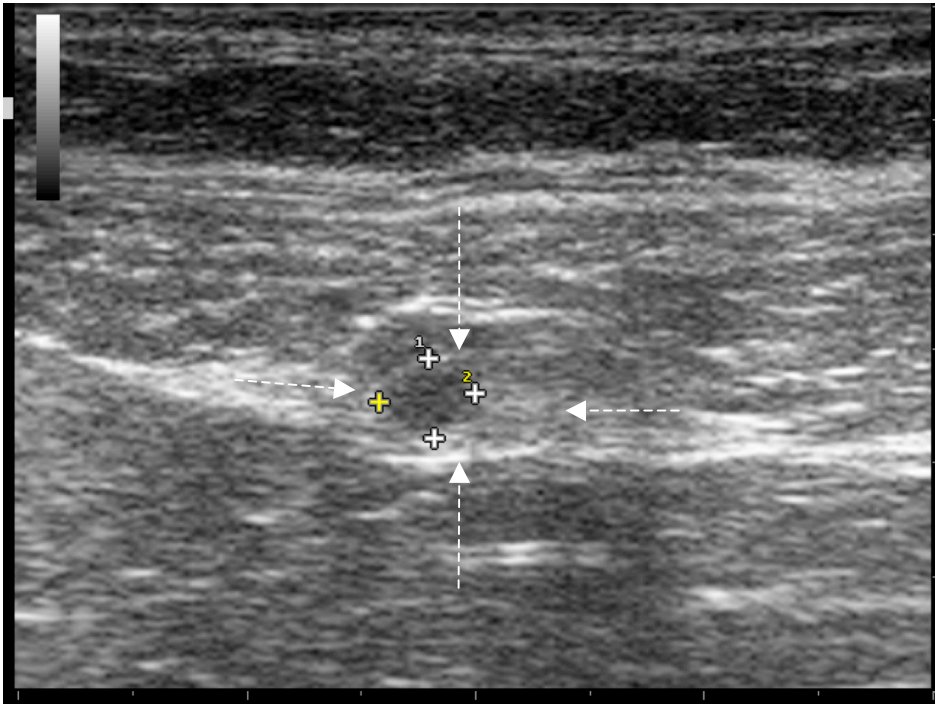


Fig. 6.III Immagine ecografica dell'ovaio destro (delimitato da frecce tratteggiate) ottenuto con sonda settoriale (8 MHz): non si riscontrano strutture evidenziabili al suo interno. (09/08/2007)

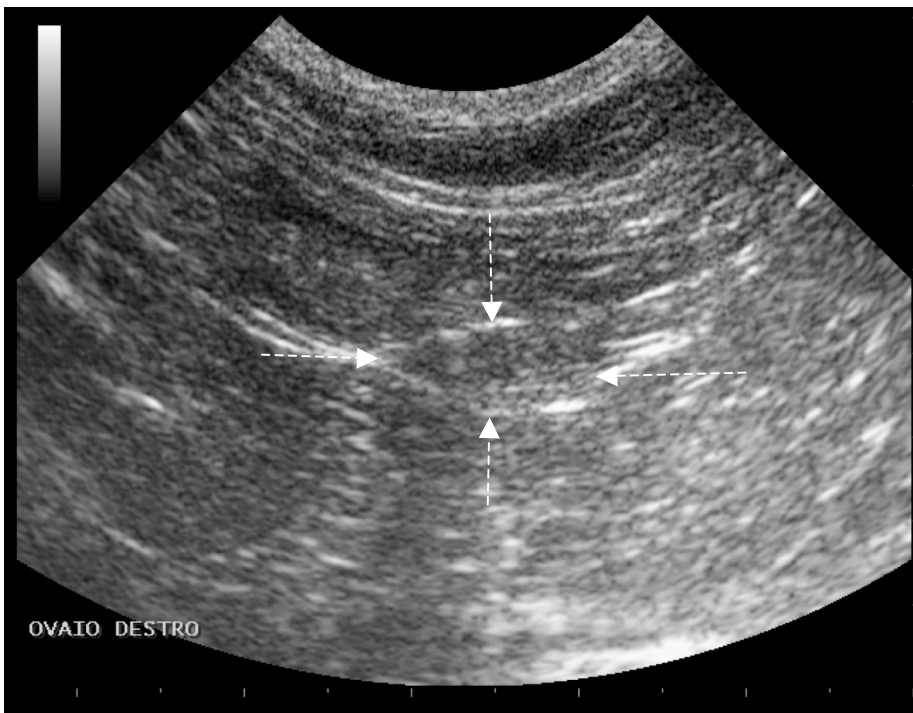


Fig. 6. IV Immagine ecografica dell'ovaio sinistro (10/10/2007, delimitato da frecce tratteggiate) ottenuta con sonda lineare (12 MHz) con struttura ipoecogena con rinforzo posteriore di dimensioni ridotte rispetto alle immagini precedenti (2.5 mm per 3.0 mm, freccia continua più spessa) e strutture ipoecogene più piccole (forse corpi lutei in formazione, freccia continua più sottile).

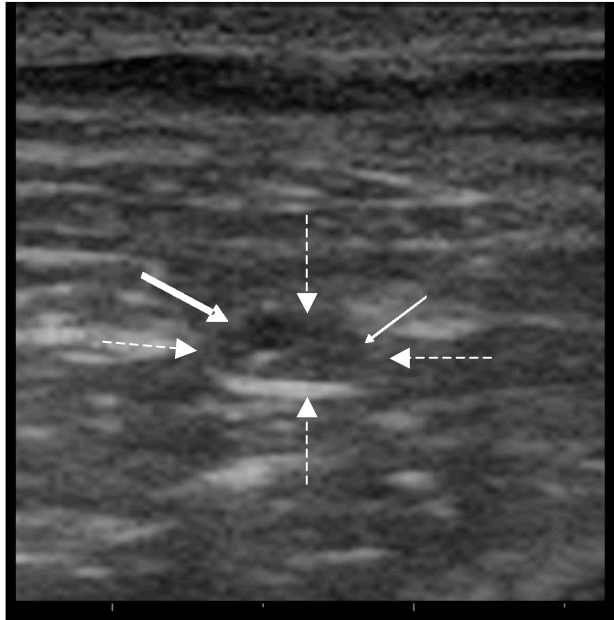
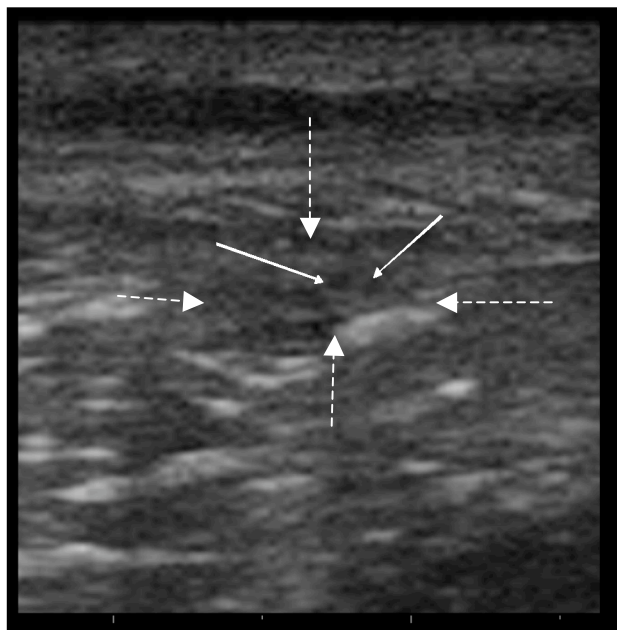


Fig. 6. V Immagine ecografica dell'ovaio destro (10/10/2007, delimitato da frecce tratteggiate) ottenuta con sonda lineare con strutture ipoecogene molto piccole (freccie continue): forse corpi lutei in formazione.



CONCLUSIONI

Lo scopo di questa tesi è stato quello di investigare il ruolo del sistema dopaminergico nella riproduzione canina.

Nel primo esperimento, la somministrazione di 5 µg/Kg/die di cabergolina in anestro (90-100 giorni dalla fine dell'estro) per 4 settimane o fino alla comparsa del proestro ha confermato che gli agonisti della dopamina sono in grado di ridurre l'intervallo interestrale ma che questo meccanismo non è mediato dalla prolattina, i cui livelli sono rimasti invariati durante l'esperimento. I dati di questo studio suggeriscono che l'azione degli agonisti della dopamina sia legata soprattutto ad un'azione diretta od indiretta sull'asse ipotalamo-ipofisi-ovaio. Inoltre l'osservazione di un aumento delle concentrazioni di LH prima dell'inizio del proestro suggeriscono che questo sia un prerequisito fondamentale per il termine della fase anestratale.

Nel secondo esperimento la misurazione dei livelli ematici di prolattina, LH e progesterone nelle cagne trattate con cabergolina (5µg/Kg/die) per 20 giorni a partire dal primo giorno di proestro, ha permesso di valutare gli effetti alla somministrazione di agonisti della dopamina durante proestro ed estro. I risultati ottenuti indicano che la somministrazione di cabergolina durante proestro ed estro non altera la durata dell'estro o lo sviluppo follicolare e/o luteale.

L'ultimo esperimento, infine, ha valutato lo sviluppo di una cisti ovarica nella specie felina. È stato osservato che le cisti ovariche nella specie felina possono andare incontro a regressione spontanea.

RINGRAZIAMENTI

Vorrei ringraziare la CEVA VETEM (Dott. R. Ballabio) per aver procurato la cabergolina, il Dott. G. Wax ed il laboratorio San Marco per le analisi ormonali e la Dott.ssa Spattini per l'indagine ecografica.

Inoltre un sentito ringraziamento al Prof. Fabio De Rensis per il costante aiuto.

Bibliografia

1. Abe H, Chihara K, Chiba T, Matsukara S e Fujita T. Effect of intraventricular injection of neurotensin and various other bioactive peptides on plasma immunoreactive somatostatin levels in rat hypophysial portal blood. *Endocrinology* 108: 1939-1943, 1981.
2. Aiudi G, Cinone M, Sciorsci RL, Minoia P. Induction of fertile oestrus in cats by administration of hCG and calcium-naloxone. *J Reprod Fertil Suppl* 57: 335-7, 2001.
3. Akil H, Watson SJ, Young E, Lewis ME, Khachaturian H e Walker JM. Endogenous opioids: biology and function. *Annu Rev Neurosci* 7: 223-255, 1984.
4. Ali S, Pellegrini I e Kelly PA. A prolactin-dependent immune cell line (Nb2) expresses a mutant form of prolactin receptor. *J Biol Chem* 266: 20110-20117, 1991.
5. Arbeiter K, Barsch E. Possibilities for oestrus induction in the bitch with an ergoline derivative. *Zentralbl Veterinarmed* 35(2): 111-117, 1988.
6. Arbogast LA e Voogt JL. Endogenous opioid peptides contribute to suckling-induced prolactin release by suppressing tyrosine hydroxylase activity and messenger ribonucleic acid levels in tuberoinfundibular dopaminergic neurons. *Endocrinology* 139: 2857-2862, 1998.
7. Archbald LF, Baker BA et al. A surgical method for collecting canine embryos after induction of oestrus and ovulation with exogenous gonadotropins. *Vet Med Small Anim Clin* 75 (2): 228-238, 1980.
8. Aylsworth CF, Hodson CA, Berg G, Kledzik G e Meites J. Role of adrenals and estrogen in regression of mammary tumors during postpartum lactation in the rat. *Cancer Res* 39: 2436-2439, 1979.

9. Bagdy G. Role of the hypothalamic paraventricular nucleus in 5-HT_{1A}, 5-HT_{2A} and 5-HT_{2C} receptor-mediated oxytocin, prolactin and ACTH/corticosterone responses. *Behav Brain Res*; 73: 277-280,1996.
10. Baker BL e Gross DS. Cytology and distribution of secretory cell types in mouse hypophysis as demonstrated with immunocytochemistry. *Am J Anat* 153: 193-215,1978.
11. Barb CR. The brain-pituitary-adipocyte axis: role of leptin in modulating neuroendocrine function. *J Anim Sci* 77: 1249-1257,1999.
12. Barber MC, Clegg RA, Finley E, Vernon RG e Flint DJ. The role of growth hormone, prolactin and insulin-like growth factors in the regulation of rat mammary gland and adipose tissue metabolism during lactation. *J Endocrinol* 135: 195-202,1992.
13. Bargellini P., Fanfoni S., Fonti P., Rubini G., Zeyen H.U. Teste atlante di ecografia addominale del cane e del gatto. Poletto ed.: 257-260, 2006.
14. Bataille D, Peillon F, Besson J e Rosselin G. Vasoactive intestinal peptide (VIP): recepteurs specifiques et activation de l'adenylate cyclase dans une tumeur hypophysaire humaine a prolactine. *C R Seances Acad Sci (III)* 228: 1315-1317,1979.
15. Beijerink NJ, Dieleman SJ, Kooistra HS, Okkens AC. Low doses of bromocriptine shorten the interestrus interval in the bitch without lowering plasma prolactin concentration. *Theriogenology* 60:1379-1386, 2003.
16. Ben-David M, Danon A, Benveniste R, Weller CP e Sulman FG. Results o radioimmunoassays of rat pituitary and serum prolactin after adrenalectomy and perphenazine treatment in rats. *J Endocrinol* 50: 599-606,1971.
17. Ben-Jonathan N e Liu J-W. Pituitary lactotrophs: endocrine, paracrine, juxtacrine, and autocrine interaction. *Trends Endocrinol Metab* 3:254-258,1992.
18. Bertherat J, Bluet-Pajot MT e Epelbaum J. Neuroendocrine regulation of growth hormone. *Eur J Endocrinol* 132: 12-24,1995.

19. Bethea CL e Neill JD. Prolactin secretion after cervical stimulation of rats maintained in constant dark or constant light. *Endocrinology* 104: 870-876, 1979.
20. Bjoro T, Torjesen PA, Ostberg BC, Sand O Iversen JG, Gautvik KM e Haug E. Bombesin stimulates prolactin secretion from cultured rat pituitary tumor cells (GH₄C₁) via activation of phospholipase C. *Regul Pept* 19: 169-182, 1987.
21. Boockfor FR, Hoeffler JP e Frawley LS. Estradiol induces a shift in cultured cells that release prolactin or growth hormone. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 250: E100-E103, 1986.
22. Bottari SP, De Gasparo M, Steckling UM e Levens NR. Angiotensin II receptor subtypes: characterization, signaling mechanism, and possible physiological implications. *Front Neuroendocrinol* 14: 123-171, 1993.
23. Bouchard G, Youngquist RS, Vaillancourt D, Krause GF, Guay P, Paradis M. Seasonality and variability of the interestrus interval in the bitch. *Theriogenology* 36(1):41-50, 1991.
24. Bouchard G., Youngquist RS, Clark B, Concannon PW, Braun WF. Estrus induction in the bitch using a combination diethylstilbesterol and FSH-P. *Theriogenology* 36:51-65, 1991.
25. Boyd JS, Renton JP, Harvey MJA, Nickson DA, Eckersall PD, Ferguson JM. Problems associated with ultrasonography of the canine ovary around the time of ovulation. *J. Reprod. Fert* 47: 101-105, 1993.
26. Brann CW, Putnam CD e Mahesh VB. Corticosteroid regulation of gonadotropin and prolactin secretion in the rat. *Endocrinology* 126: 59-166, 1990.
27. Bridges RS, Numan M, Ronsheim PM, Mann PE e Lupini CE. Central prolactin infusions stimulates maternal behaviour in steroid-treated, nulliparous female rats. *Proc Natl Acad Sci USA* 87: 8003-8007, 1990.
28. Bruce HM. Olfaction. *J Reprod Fertil Suppl* 19:403-404, 1973.
29. Bruce HM. Pheromones. *Br Med Bull* 26:10-13, 1970.

30. Buff S. Protocollo di induzione nella cagna. *Summa* 7:7-13, 2002.
31. Calogero AE, Weber RF, Raiti F, Burrello N, Moncada ML, Mongioi A e D'Agata R. Involvement of corticotropin-releasing hormone and endogenous opioid peptides in prolactin-suppressed gonadotropin-releasing hormone release in vitro. *Neuroendocrinology* 60: 291-296, 1994.
32. Carraway RE e Leeman SE. Isolation of a ewe hypotensive peptide, neurotensin, from bovine hypothalami. *J Biol Chem* 248: 6854-6861, 1973.
33. Carretero J, Rubio M, Sánchez F, Cabo JJ, Vázquez G, Santos M, Pérez RM e Vázquez R. Corticosterone induces hypoactivity of prolactin-immunoreactive cells. *Acta Anat* 160: 15-20, 1997.
34. Chabot JG, Enjalbert A, Pelletier G, Dubois PM e Morel G. Evidence for a direct action of neuropeptide Y in the rat pituitary gland. *Neuroendocrinology* 47: 511-517, 1988.
35. Chaktaborty PK, Wildt DE, Seager SW. Induction of estrus and ovulation in the cat and dog. In: *Symposium on hormone and corticosteroid therapy*. *Vet Clin N Am Small Anim Pract* 12: 85-91, 1982.
36. Chen CL e Meiters J. Effects of estrogen and progesterone on serum and pituitary levels in ovariectomized rats. *Endocrinology* 86: 503-505, 1970.
37. Chen HJ, Bradley CJ e Meiters J. Stimulation of carcinogen-induced mammary tumor growth in rats by adrenalectomy. *Cancer Res* 36: 1414-417, 1976.
38. Christiansen I J. *Reproduction in the dog and cat*. London: Baillière Tindall. 1984.
39. Clapp C e De la Escalera GM. Prolactins: novel regulators of angiogenesis. *News Physiol Sci* 12: 231-237, 1997.
40. Cline EM, Jennings LL, Sojka NJ. Breeding laboratory cats during artificially induced estrus. *Lab Anim Sci* 30: 1003-1005, 1980.
41. Colby ED. Induced estrus and timed pregnancies in cats. *Lab Anim Care* 20: 1075-1080, 1970.

42. Concannon PW, Hansel W, Visek WJ. The ovarian cycle of the bitch: plasma oestrogen, LH and progesterone. *Biol Reprod* 13:112-121, 1975.
43. Concannon PW, McCann JP, Temple M. Biology and endocrinology of ovulation, pregnancy and parturition in the dog. *J. Reprod. Fert.(Suppl)* 39:3-26, 1989.
44. Concannon PW. Biology of gonadotropin secretion in adult and prepubertal female dogs. *J Reprod Fertil Suppl* 47: 3-27, 1993.
45. Corrada Y, Rimoldi I, Arreseigor S, Marecco G, Gobello C. Prolactin reference range and pulsatility in male dogs. *Theriogenology* 66: 1599-1602, 2006.
46. Dahlstrom A e Fuxe K. Evidence for the existence of monoaminergic containing neurons in the central nervous system. I. Demonstration of monoamines in cell bodies of brain stem neurons. *Acta Physiol Scand Suppl* 62 (232):1-55, 1964.
47. Davis JA e Linzer DIH. Expression of multiple forms of the prolactin receptor in mouse liver. *Mol Endocrinol* 3: 674-680, 1989.
48. De Gier J, Kooistra HS, Djajadiningrant-Laanen SC, Dieleman SJ, Okkens AC. Differential regulation of the secretion of luteinizing hormone around the time of ovulation in the bitch. *Theriogenology* 66: 1419-1422, 2006.
49. Devins SS, Miller A, Herndon BL, O'Toole L e Reisz G. Effects of dopamine on T-lymphocyte proliferative responses and serum prolactin concentrations in critically ill patients.. *Critic Care Med* 20: 1644-1649, 1992.
50. Di Salle E, Ornati G, Briatico G. FCE 21336, a new ergoline derivate with a potent and long acting lowering effect on prolactin secretion in rats. *J Endocrinol Invest (Suppl)* 5: 45, 1983.
51. Dingledine R, Myers SJ e Nicholas RA. Molecular biology of mammalian amino acid receptors. *FASEB J* 4:2636-2645, 1990.
52. Dohanics J, Smith MS, Blackburn RE e Verbalis JG. Osmotic inhibition of prolactin secretion in rats. *J Neuroendocrinol* 6: 291-298, 1994.

53. Dow C. Experimental uterine infection in the domestic cat. *Journal of Comparative Pathology* 72: 303-307, 1962.
54. Dow C. The cystic hyperplasia-pyometra complex in the cat. *Veterinary Record* 74: 141-147, 1962.
55. Drust DS e Martin TF. Thyrotropin- releasing hormone rapidly activates protein phosphorylation in GH₃ pituitary cells by a lipid-linked, protein kinase C-mediated pathway. *J Biol Chem* 259: 14520-14530, 1984.
56. Duke S. *Fisiologia degli animali domestici*. Edit. Idelson-Gnocchi, 2002.
57. Duvilanski BH, Zambruno C, Seilicovich A, Pisera D, Lasaga M, Diaz MDC, Belova N, Rettori V e McCann SM. Role of nitric oxide in control of prolactin release by the adenohypophysis. *Proc Natl Acad Sci USA* 92:170-174, 1995.
58. Ebling FJP, Wood RI, Suttie JM, Adel TE e Foster DL. Prenatal photoperiod influences neonatal prolactin secretion in the sheep. *Endocrinology* 125:384-391, 1989.
59. England CGW, Yeager AE. Ultrasonographic appearance of the ovary and uterus of the bitch during oestrus, ovulation and early pregnancy. *J Reprod Fertil (suppl)* 107-117, 1993.
60. Enjalbert A, Arancibia S, Priam M, Bluet-Pajot MT e Kordon C. Neurotensin stimulation of prolactin secretion in vitro. *Neuroendocrinology* 34: 95-98, 1982.
61. Ferguson AV e Washburn DLS. Angiotensin II: a peptidergic neurotransmitter in central autonomic pathways. *Prog Neurobiol* 54: 169-192, 1998.
62. Flietstra RJ e Voogt JL. Lactogenic hormones of the placenta and pituitary inhibit suckling-induced prolactin (PRL) release but not the ante-partum PRL surge. *Proc Soc Exp Biol Med* 214: 258-264, 1997.
63. Franci CR, Anselmo-Franci JA e McCann SM. The role of endogenous atrial natriuretic peptide in resting and stress-induced release of corticotropin, prolactin, growth hormone, and thyroid-stimulating hormone. *Proc Natl Acad Sci USA* 89: 11391-11395, 1992.

- 64.Frawley LS, Mulchahey JJ e Neill JD. Nursing induces a biphasic release of prolactin in rhesus monkeys. *Endocrinology* 112: 558-561,1983.
- 65.Freeman ME, Kanyicska B, Lerant A e Nagy G. Prolactin: structure, function and regulation of secretion. *Physiological Reviews* 80 (4): 1523-1631,2000.
- 66.Freeman ME. The neuroendocrine control of the ovarian cycle of the rat. *The physiology of reproduction*, edited by Knobil E e Neill JD. New York: Raven;613-658,1994.
- 67.Gala RR.The physiology and mechanism of the stress-induced changes in prolactin secretion in the rat. *Life Sci*; 46: 1407-1420,1990.
- 68.Gelberg H.B., McEntee K., Heath E:H. Feline cystic rete ovarii. *Veterinary Pathology* 21:304-304, 1984.
- 69.Gibbs DM, Plotsky PM, De GreefWJ e Neill JD. Effect of histamine and acetylcholine on hypophysial stalk plasma dopamine and peripheral plasma prolactin levels. *Life Sci* 24: 2063-2070,1979.
- 70.Gibbs DM. High concentrations of oxytocin in hypophysial portal plasma. *Endocrinology* 114: 1216-1218,1984.
- 71.Goodrowe K, Howeward JG, Schmidt PM, Wildt DE. Reproductive biology of the domestic cat with special reference to endocrinology, sperm function and in vitro fertilization. *J Reprod Fert Suppl* 30: 73-90, 1989.
- 72.Goodrowe K.L. and Wildt D.E., Ovarian response to human chorionic gonadotropin or gonadotropin releasing hormone in cats in natural or induced estrus *Theriogenology* 27: 811-817,1987.
- 73.Gorospe WC e Freeman ME. A ovarian role in prolonging and terminating the two surges of prolactin in pseudopregnant rats. *Endocrinology* 108: 1293-1298,1981.
- 74.Graham LH, Swanson WF, Wildt DE, Brown JL. Influence of oral melatonin on natural and gonadotropin-induced ovarian function in the domestic cat. *Theriogenology* 61: 1061-1076, 2004

75. Grattan DR e Waverill RL. Role of the placenta in the control of the ante-partum surge of prolactin in the rat. *J Endocrinol* 130: 401-407,1991.
76. Greulich WW. Artificially induced ovulation in the cat (*Felis domestica*). *Anatomical Record* 58: 217-224, 1934.
77. Grosvenor CE e Keenan TW. Hormones and growth factors in milk. *Endocr Rev* 14: 710-728,1992.
78. Grosvenor CE e Whitworth N. Evidence for a steady rate of secretion of prolactin following suckling in the rat. *J Dairy Sci* 57: 900-904,1974.
79. Günzel-Abe AR, Kawauchi R, Nautruo CP, Hedrich HJ. Sonographic presentation of the physiologic ovarian function in the anovulatory and pseudopregnant cycle of the cat. *Tierarztl Prax Ausg K Klientiere Heimtiere* 26(4): 275-283, 1998.
80. Hadley JC. The effect of serial uterine biopsies and hysterectomy on peripheral blood levels of total unconjugated oestrogen and progesterone in the bitch. *J Reprod Fertil* 45: 389-393, 1975.
81. Haisenleder DJ, Gala RR e Lawson DM. Comparison of the effects of suckling or transient dopamine antagonism on thyrotropin-releasing hormone and suckling induced prolactin release in lactating rats. *Life Sci* 39: 659-664,1986.
82. Halasz B. Hypothalamo-anterior pituitary system and pituitary portal vessels. *The pituitary gland*, edited by Imura H. New York: Raven 1-28,1994.
83. Hase M, Hory T, Kawakami E, Tsutsui T. Plasma LH and progesterone levels before and after ovulation and observation of ovarian follicles by ultrasonographic diagnosis system in the dog. *J Vet Med Sci* 62:243-248, 2000.
84. Hinkle PM e Tashjian AHJ. Receptors for thyrotropin-releasing hormone in prolactin producing rat pituitary cells in culture. *J Biol Chem* 248: 6180-6186,1973.
85. Hinuma S, Habata Y, Fujii R, Kawamata Y, Hosoya N, Fukusumi S, Kitada C, Masuo Y, Asano T, Matsumoto H, Sekiguchi M, Kurkawa T, Nishimura O,

- Onda H e Fujino M. A prolactin-releasing peptide in the brain. *Nature*; 393: 272-276,1998.
- 86.Hoffman JC e Cullin AM. Effects of pinealectomy and constant light on the estrous cycles of female rats. *Neuroendocrinology* 17: 167-174,1975.
- 87.Hokfelt T, Goldstein M e Johansson O. Immunohistochemical evidence for the existence of adrenaline neurons in the rat brain. *Brain Res* 66:235-251,1974.
- 88.Horvath TL, Kalra SP, Naftolin F e Leranth C. Morphological evidence for a galanin-opiate interaction in the rat mediobasal hypothalamus. *J Neuroenocr* 7: 579-588,1995.
- 89.Houben H e Deneff C. Bioactive peptides in anterior pituitary cells. *Peptides* 15: 775-780,1994.
- 90.Huang SK e Pan JT. Stimulatory effects of vasoactive intestinal peptide and pituitary adenylate cyclase-activating peptide on tuberoinfundibular dopaminergic neuron activity in estrogen-treated ovariectomized rats and their correlation with prolactin secretion. *Neuroendocrinology* 64: 208-214,1996.
- 91.Hull ME, Kenigsberg DJ. Gonadotropin releasing hormone: function and clinical use. *Lab Manag* 25:51-58, 1987.
- 92.Hyde JF, North WG e Ben-Jonathan N. The vasopressin-associated glycopeptide is not a prolactin-releasing factor: studies with lactating Brattleboro rats. *Endocrinology* 125: 35-40,1989.
- 93.Ijaz A, Fahning ML, Zemjanis R. Treatment and control of cystic ovarian disease in dairy cattle: a Review. *Br vet J* 143: 226-237, 1987.
- 94.Inaba T, Tani H, Gonda M, Nakagawa A, Phumura M, Mori J. Induction of fertile estrus in bitches using a sustained-release formulation of a GnRH agonist (leuprolide acetate). *Theriogenology* 49: 975-982, 2005.
- 95.Jeukenne P, Verstegen J. Termination of diestrus and induction of oestrus in diestrous non pregnant bitches by the prolactin antagonist cabergoline. *J Reprod Fertil Suppl* 51:59-66, 1997.

96. Jochle W, Arbeiter K, Post K, Ballabio R, D'Ver AS. Effects on pseudopregnancy, pregnancy and interoestrus intervals of pharmacological suppression of prolactin secretion in female dogs and cats. *J Reprod Fert (suppl)* 39: 199-207, 1989.
97. Kanyicska B e Freeman ME. Characterization of endothelin receptors in the anterior pituitary gland. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 265: E601-E608, 1993.
98. Kanyicska B, Lerant A e Freeman ME. Endothelin is an autocrine regulator of prolactin secretion. *Endocrinology* 139: 5164-5173, 1998.
99. Kato Y, Nakai Y, Imura H, Chihara K e Ogo S. Effect of 5-hydroxytryptophan (5-HTP) on plasma prolactin levels in man. *J Clin Endocrinol Metab* 38: 695-697, 1974.
100. Kennaway DJ, Dunstan EA, Gilmore TA e Seamark RF. Effects of shortened daylength and melatonin treatment on plasma prolactin and melatonin levels in pinealectomised and sham-operated ewes. *Anim Reprod Sci* 5: 287-294, 1982.
101. Khawaja AM e Rogers DF. Tachykinins: receptors to effector. *Int J Biochem Cell Biol* 28: 721-738, 1996.
102. King SS, Campbell AG, Dille EA, Roser JF, Murphy LL, Jones KL. Dopamine receptors in equine ovarian tissue. *Domest Anim Endocrinol* 28: 405-415, 2005.
103. Kizer JS, Zisin JA, Jacobowitz DM e Kopin IJ. The nyctohemeral rhythm of plasma prolactin: effects of ganglionectomy, pinealectomy, constant light, constant darkness or 6-OH-dopamine administration. *Endocrinolog* 96: 1230-1240, 1975.
104. Kooistra HS, Okkens AC, Bevers MM, Popp-Snijders C, Van Haften B, Dieleman SJ, et al. Concurrent pulsatile secretion of luteinizing hormone during different phases of oestrus cycle and anestrus in beagle bitches. *Biol Reprod* 60: 65-71, 1999.
105. Kooistra HS, Okkens AC, Bevers MM, Popp-Snijders C, Van Haften B, Dieleman SJ, et al. Bromocriptine-induced premature oestrus is associated with

- changes in the pulsatile secretion pattern of follicle-stimulating hormone in beagle bitches. *J Reprod Fertil* 117: 387-393, 1999.
106. Koshaka A, Watanobe H, Kazikazi Y, Habu S e Suda T. A significant role of leptin in the generation of steroid-induced luteinizing hormone and prolactin surges in female rats. *Biochem Biophys Res Commun* 254:; 578-581, 1999.
107. Koshiyama H, Shimatsu A, Assadian H, Hattori N, Ishikawa Y, Tanoh T, Yanaihara N, Kato Y e Imura H. Galanin interacts with serotonin in stimulating prolactin secretion in the rat. *J Neuroendocrinology* 2: 217-220, 1990.
108. Krulich L, Koenig JL, Conway S, McCann SM e Mayfield MA. Opioid kappa receptors and the secretion of prolactin (PRL) and growth hormone (GH) in the rat. I. Effects of opioid receptors agonists bremazocine nd U-50, 488 on secretion of PRL and GH: comparison with morphine. *Neuroendocrinology* 42: 75-81, 1986.
109. Kurokawa K, Yamada H e Ochi J. Topographical distribution of neurons containing endothelin type A receptor in the rat brain. *J Comp Neurol* 389: 348-360, 1997.
110. Kutzler MA, Wheeler R, Volkman DH. Canine oestrus induction using the GnRH agonist, desorelin. *Proc Ann Symp Eur Vet Soc Sm Anim Reprod* 147-148, 2001.
111. Kutzler MA. Estrus induction and synchronization in canids and felids. *Theriogenology* 68:354-374, 2007.
112. Lamberts SW e MacLeod RM. The interaction of the serotonergic and dopaminergic systems on prolactin secretion in the rat. The mechanism of action of the “specific” serotonin receptor antagonist, methysergide. *Endocrinology* 103: 287-295, 1978.
113. Lawler DF, Johnston SD, Hegstad RL, Keltner DG, Owens SF. Ovulation without cervical stimulation in domestic cats. *J Reprod. Fert Suppl.* 47: 57-61, 1993.

114. Lesueur L, Edery M, Ali S, Paly J, Kelly PA e Djiane J. Comparison of long and short forms of the prolactin receptor on prolactin-induced milk protein gene transcription. *Proc Natl Acad Sci USA* 88: 824-828,1991.
115. Leyva H, Madley T, Stabenfeldt GH. Effect of melatonin on photoperiod responses, ovarian secretion of oestrogen, and coital responses in the domestic cat. *J Reprod. Fert Suppl* 39: 135-142, 1989.
116. Lin JY, Li CS e Pan JT. Effects of various neuroactive substances on single-unit activities of hypothalamic arcuate neurons in brain slices. *Brain Res Bull*; 31: 587-594,1993.
117. Lumpkin MD, Swanson WK e McCann SM. Hypothalamic and pituitary sites of action of oxytocin to alter prolactin secretion in the rat. *Endocrinology* 112: 1711-1718,1983.
118. Malarkey WB, Odorisio TM, Kennedy M e Cataland S. The influence of vasoactive intestinal polypeptide and cholecystokinin on prolactin release in the rat and human monolayer cultures. *Life Sci* 28:2489-2495, 1981.
119. Marcato P.S. *Patologia sistemica veterinaria*. Edagricole: 1004-1006, 2002.
120. Martinez De La Escalera G, Guthrie J e Weiner RI. Transient removal of dopamine potentiates the stimulation of prolactin release by TRH but not VIP: stimulation by Ca²⁺/protein kinase C pathway 1. *Neuroendocrinology* 47: 38-45,1988.
121. Matsuyama S, Chang KT, Kanuka H, Ohinshi M, Ikeda A, Nishihara M Taakahashi M. Occurrence of deoxyribonucleic acid fragmentation during prolactin-induced structural luteolysis in cycling rats. *Biol Reprod* 54: 1245-1251,1996.
122. McCann SM e Vijayan E. Control of anterior pituitary hormone secretion by neurotensin. *Ann NY Acad Sci* 668: 287-297,1992.

123. Meador-Woodruff JH, Mansour A, Bunzow JR, Van Tol HHM, Watson S Jr e Civelli O. Distribution of D₂ dopamine receptor mRNA in the rat brain. *Proc Natl Acad Sci USA* 86: 7625-7628, 1989.
124. Minamino N, Kangawa K e Matsuo H. Neuromedin B and neuromedin C: two mammalian bombesin-like peptides identified in porcine spinal cord and brain. *Ann NY Acad Sci* 547: 373-390, 1988.
125. Müller EE, Nistico G. Neurotransmitter regulation of the anterior pituitary. In: Müller E, Nistico G (eds), *Brain Messengers and the pituitary*. San Diego: academic press 488-513, 1989.
126. Murai I, Reichlin S e Ben-Jonathan N. The peak phase of the proestrus prolactin surge is blocked by either posterior pituitary lobectomy or antisera to vasoactive intestinal peptide. *Endocrinology* 124: 1050-1055, 1989.
127. Myers LS e Steele MK. The brain renin-angiotensin system and prolactin secretion in the male rat. *Endocrinology* 129: 1744-1748, 1991.
128. Myers LS e Steele MK. The brain renin-angiotensin system and the regulation of prolactin secretion in female rats: influence of ovarian hormones. *J Neuroendocrinology* 1:299-303, 1989.
129. Nagy E, Berczi I, Wren E, Asa SL e Kovacs K. Immunomodulation by bromocryptine. *Immunopharmacology* 6:231-243, 1978.
130. Neill JD. Effect of "stress" on serum prolactin and luteinizing hormone levels during the estrous cycle of the rat. *Endocrinology* 87: 1192-1197, 1970.
131. Niswender GD e Nett TM. Corpus luteum and its control in infraprimate species. In: *The Physiology of Reproduction*, edited by Knobyl E and Neill JD. New York: Raven,,: 781-816, 1994.
132. Nolin JM e Witorsch RJ. Detection of endogenous immunoreactive prolactin in the rat mammary epithelial cells during lactation. *Endocrinology* 99: 949-958, 1976.

133. Nyland T.G., Mattoon J.S. Ovaries and uterus in Small Animal Diagnostic ultrasound second edition, Saunder ed. 231-233,2002.
134. Okkens AC, Bevers MM, Dieleman SJ, Willemse AH. Shortening of the interoestrus interval and the lifespan of the corpus luteum of the cyclic dog by bromocryptine treatment. *The veterinary quarterly* 7:169-173, 1985.
135. Okkens AC, Dieleman SJ, Kooistra HS, Bevers MM. Plasma concentration of prolactin in overtly pseudopregnant afghan hounds and the effect of methergoline. *J Reprod Fertil (suppl)* 51:295-301, 1997.
136. Okkens AC, Kooistra HS, Dieleman SJ, Bevers MM. Dopamine agonist effects as opposed to prolactin concentrations in plasma as the influencing factor on the duration of anoestrus in bitches. *J Reprod Fertil (Suppl)* 51: 55-58,1997.
137. Okkens AC, Kooistra HS. Anoestrus in the dog: a fascinating story. *Reproduction in domestic animals* 41(4), 291-296, 2006.
138. Olson PN, Bowen RA, Behrendt MA, Olson JD, Nett TM. Concentrations of reproductive hormones in canine serum through out late anestrus, pro-estrus and estrus. *Biol Reprod* 27: 1196-1206,1982.
139. Onclin K, Verstegen J, Silva LDM, Concannon P. Patterns of circulating prolactin, LH and FSH during dopamine-agonist induced termination o anestrus in beagle dogs. *Biol Reprod* 52: 314-319,1995.
140. Pan JT, Kow LM e Pfaff DW. Single-unit activity of hypothalamic arcuate neurons in brain tissue slices. Effects of the anterior pituitary hormones, cholecystokinin-octapeptide and neurotransmitters. *Neuroendocrinology* 43: 189-196,1986.
141. Patel YC e Srikant CB. Somatostatin mediation of adenohipophyseal secretion. *Annu Rev Physiol* 48: 551-567,1986.
142. Pelican KM, Wildt DE, Howard JG. Short-term inhibition of ovarian activity using the GnRH agonist, leuprolide acetate, in the clouded leopard. *Theriogenology* 55: 394,2001.

143. Pelican KM, Wildt DE, Howard JG. The GnRH agonist, leuprolide acetate, prevents ovulation following gonadotropin stimulation in the clouded leopard (*Neofelis nebulosa*). In: Fifth international symposium on canine and feline reproduction, Embu das Artes:127-128,2004.
144. Phillips TC, Larsen RE, Hernandez J, Strachan L, Samuelson D, Shille VM, Archbald LF. Selective control of the estrous cycle of the dog through suppression of estrus and reduction of the length of anestrus. *Theriogenology* 59: 1441-1448, 2003.
145. Rains CP, Bryson HM, Fitton A. Cabergoline: a review of its pharmacological properties and therapeutic potential in the treatment of hyperprolactinaemia and inhibition of lactation. *Drugs* 49: 255-280,1995.
146. Raymond V, Beaulieu M, Labrie F e Boissier J. Potent antidopaminergic activity of estradiol at the pituitary level on prolactin release. *Science* 200: 1173-1175,1978.
147. Reichlin S. Somatostatin. *N Engl J Med* 309: 910,1984.
148. Rivier C, Brown M e Vale W. Effect of neurotensin, substance P and morphine sulfate of the secretion of prolactin and growth hormone in the rat. *Endocrinology* 100: 751-754,1977.
149. Root MV, Johnston SD, Olson PN. Estrus length, pregnancy rate, gestation and parturition lengths, litter size, and juvenile mortality in the domestic cat. *J Am Anim Hosp Assoc* 31(5): 429-433, 1995.
150. Rota A, Mollo A, Marinelli L, Gabai G, Vincenti L. Evaluation of cabergoline and Buserelin efficacy for oestrus induction in the bitch. *Reprod Domest Anim* 38: 440-443,2003.
151. Savedra JM. Brain and pituitary angiotensin. *Endocr Rev* 13: 329-380,1992.
152. Samson WK, Skala KD, Alexaner BD e Shuang F-L. Pituitary site of action of endothelin: selective inhibition of prolactin release in vitro. *Biochem Biophys Res Commun* 169: 737-743,1990.

153. Schmidt PM, Chakraborty PK, Wildt DE. Ovarian activity, circulating hormones and sexual behavior in the cat. *Biol Reprod* 28: 657-671,1983.
154. Shaw D e Goldman Bd. Gender differences in influence of prenatal photoperiods on postnatal pineal melatonin rhythms and serum prolactin and follicle-stimulating hormone in the Siberian hamster (*Phopodus sungorus*). *Endocrinology* 136: 4237-4246,1995.
155. Shennan DB. Regulation of water and solute transport across mammalian plasma cell membranes by prolactin. *J Dairy Res* 61: 15-166,1994.
156. Shille VM, Thatcher MJ, Simmons KJ. Efforts to induce estrus in the bitch, using pituitary gonadotropins. *J Am Vet Med Assoc* 184: 1469-1473, 1984.
157. Sibilina V, Netti C, Guidobono F, Cazzamalli E e Peciloe A. Effect of calcitonin gene-related peptide on prolactin secretion. *Pharmacol Res* 21: 97-98,1989.
158. Smith MS, Freeman ME e Neill JD. The control of progesterone secretion during the estrous cycle and early pseudopregnancy in the rat: prolactin, gonadotropin and steroid levels associated with rescue of the corpus luteum of pseudopregnancy. *Endocrinology* 96:219-226,1975.
159. Sodersten P, Hansen S e Eneroth P. Evidence that prolactin does not affect the induction of sexual behavior by oestradiol and progesterone in ovariectomized rats. *J Endocrinol* 99: 181-187,1983.
160. Sortino MA, Aleppo G, Scapagnini U e Canonico PL. Comparative effects of eel calcitonin, salmon calcitonin and [Asul, 7]eel calcitonin on hypophyseal and osteoblastic function. *Gynecol Endocrinol* 7:89-96,1993.
161. Spattini G, Giaconella R, De Rensis F. L'indagine ecografica dell'attività ovarica nella cagna durante il ciclo estrale. *Veterinaria* 2:31-38, 2003.
162. Steele MK. The role of brain angiotensin II in the regulation of luteinizing hormone and prolactin secretion. *Trends Endocrinol Metab* 9:295-301,1992.

163. Sutton CA e Martin TF. Thyrotropin- releasing hormone (TRH) selectively and rapidly stimulates phosphatidylinositol turnover in GH pituitary cells: a possible second step of TRH action. *Endocrinology*. 110: 1273-1280,1982.
164. Swanson WF, Bond JB, Steinetz BG, McRae MA. Fetal and neonatal development of domestic cats produced from in vitro fertilization and laparoscopic oviductal embryo transfer versus natural mating. *Theriogenology* 55: 371,2001.
165. Swanson WF, Horohov DW, Godke RA. Production of exogenous gonadotrophin-neutralizing immunoglobins in cats after repeated eCG-hCG treatment and relevance for assisted reproduction in felids. *J Reprod Fertil* 105:35-41, 1995.
166. Tainturier D, Handaja, Kusuma PS et al. Déclenchement des chaleurs chez la chienne par une antiprolactine: la métergoline. *Prat Méd Chir Anim Comp* 29: 197-203, 1994.
167. Terkel J, Damassa DA e Sawyer CH. Ultrasonic cries from infant rats stimulate prolactin release in lactating mothers. *Horm Behav* 12: 95-102,1979.
168. Thun R, Watson P et al. Induction of oestrus and ovulation in the bitch, using exogenous gonadotropins. *Am J Vet Res* 38(4): 483-486, 1977.
169. Tougard C e Tixier-Vidal A. Lactotropes and gonadotropes. In: *The physiology of reproduction*, eduted by Knobyl E and Neill J. New York: Raven: 1711-1747,1994.
170. Trigg TE, Doyle AG, Walsh JD, Swangchan-uthai T. A review of advances in the use of GnRH agonist deslorelin in control of reproduction. *Theriogenology* 66:1507-1512, 2006.
171. Tsuruo Y, Kawano H, Nishiyama T, Hisano S. e Daikoku S. Substance P-like immunoreactive neurons in the tuberoinfundibular area of rat hypothalamus. *Light and electronmicroscopy*. *Brain Res* 289: 1-9,1983.

172. Tsutsui T, Nakagawa K, Hirano T, Nagakubo K, Shinomiya M, Yamamoto K, Hori T. Breeding season in female cat acclimated under a natural photoperiod and interval until puberty. *J.Vet.Med Sci* 66(9): 1129-1132, 2004.
173. Tsutsui T, Stabenfeldt GH. Biology of ovarian cycles, pregnancy and pseudopregnancy in the domestic cat. *J. Reprod. Fert., Suppl.* 47: 29-35, 1993.
174. Tsutsui T, Yamane I, Hattori I, Kurosawa N, Matsunaga H, Murao I, et al. Feline embryo transfer during the non-breeding season. *J Vet Med Sci* 62: 1169-75, 2000.
175. Tucker HA. Lactation and its hormonal control. In: *The physiology of reproduction*, edited by Knobil E e Neill JD. New York: Raven: 1065-1098, 1994.
176. Tuomisto J e Mannisto. Neurotransmitter regulation of anterior pituitary hormones. *Pharmacol Rev* 37: 249-332, 1985.
177. Vale W, Rivier C, Brazeau P e Guillemin R. Effects of somatostatin on the secretion of thyrotropin and prolactin. *Endocrinology* 95: 968-977, 1974.
178. Verhage HG, Beamer NB, Brenner RM. Plasma levels of oestradiol and progesterone in the cat during oestrus, pregnancy and pseudo-pregnancy. *Biol Reprod* 14:579-85, 1976.
179. Verstegen J, Onclin K, Silva L, Concannon P. Termination of fertile ovarian cycles in dogs by administration of purified pig LH. *J Reprod Fertil (suppl)* 111:35-40, 1997.
180. Verstegen JP, Onclin K, Silva LDM, Concannon PW. Effect of stage of anestrus on the induction of estrus by the dopamine agonist Cabergoline in dogs. *Theriogenology* 51: 597-611, 1999.
181. Verstegen JP, Onclin Silva LDM, Concannon PW. Induzione dell'estro con cabergolina somministrata alla cagna durante diverse fasi dell'anestro. *Riv Zoof Vet* 29(1): 25-38, 2001.

182. Viguie C, Thibault J, Thiery JC e Malpoux B. Characterization of the short day-induced decrease in median eminence tyrosine hydroxylase activity in the ewe: temporal relationship to the changes in luteinizing hormone and prolactin secretion and short day-like effect of melatonin. *Endocrinology* 138: 49-506,1997.
183. Volkmann DH, Kutzler MA, Wheeler R, Krekeler N. The use of deslorelin implants for the synchronization of estrous in diestrous bitches. *Theriogenology* 66:1497-1501, 2006.
184. Walsh JH, Wong HC e Dockray GJ. Bombesin-like peptides in mammals. *Federations Proc* 38: 219-225,1979.
185. Walters CA, Daly DC, Chapitis J, Kuslis ST, Prior JC, Kusmik WF and Riddick DH. Human Myometrium: a new potential source of prolactin. *Am J Obstet Gynecol* 147: 639-644,1983.
186. Wang J, Ciofi P and Crowley WR. Neuropeptide Y suppresses prolactin secretion from rat anterior pituitary cells: evidence for interactions with dopamine through inhibitory coupling to calcium entry. *Endocrinology* 137: 587-594,1996.
187. Watanobe H and Takabe K. In vivo release of neurotensin from the median eminence of ovariectomized estrogen-primed rats as estimated by push-pull perfusion: correlation with luteinizing hormone and prolactin surges. *Neuroendocrinology* 57: 760-764,1993.
188. Wildt DE, Charman Guthrie S, Seager SWJ. Ovarian and behavioral cyclicity of the laboratory maintained cat, 2004.
189. Wojcikiewick RJH, Dobson PR and Brown BL. Muscarinic acetylcholine receptor activation causes inhibition of cyclic AMP accumulation, prolactin, and growth hormone secretion in GH₃ rat anterior pituitary tumor cells. *Biochim Biophys Acta* 805: 25-29,1984.

190. Wright PJ. The induction of oestrus in the bitch using daily injections of pregnant mare serum gonadotrophin. *Aust Vet J* 59(4): 123-124, 1982.
191. Wynick D, Smith DM, Ghatei M, Akinsanya K, Bhogal R, Purkiss P, Byfield P, Yanaihara N and Bloom SR. Characterization of a high-affinity galanin receptor in the rat anterior pituitary: absence of biological effect and reduced membrane binding of the antagonist M15 differentiate it from the brain/gut receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 90: 4231-4235, 1993.
192. Yuan ZF and Pan JT. Stimulatory effect of central oxytocin on tuberoinfundibular dopaminergic neuron activity and inhibition on prolactin secretion: neurochemical and electrophysiological studies. *Endocrinology* 137: 4120-4125, 1996.
193. Zambelli D, Belluzzi S, Mar G. Estrus induction in cat with cabergoline: preliminary studies, Atti 4° congresso Europeo FECAVA, Bologna 528, 1998.
194. Zambelli D, Cunto M. Vaginal and cervical modifications during the estrus cycle in the domestic cat. *Theriogenology* 64: 679-684, 2005.
195. Zöldág L, Fekete S, Csáky I, Bersényi A. Fertile estrus induced in bitches by bromocryptine, a dopamine agonist: a clinical trial. *Theriogenology* 55:1657-1666, 2001.